

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>5</sup>:C12N 15/87, 7/04, 5/10, 15/44, 15/47,  
A61K 48/00, 47/48 // C12N 15/23, 15/26

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/21808

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

29. September 1994 (29.09.94)

## (21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP94/00859

## (22) Internationales Anmeldedatum:

18. März 1994 (18.03.94)

## (30) Prioritätsdaten:

556/93  
P 43 26 821.819. März 1993 (19.03.93)  
10. August 1993 (10.08.93)AT  
DE

Argentinienerstrasse 36, A-1040 Wien (AT). SCHMIDT, Walter [DE/AT]; Steingasse 2A, A-1030 Wien (AT). WAGNER, Ernst [AT/AT]; Wiener Strasse 201, A-2103 Langenzersdorf (AT). ZATLOUKAL, Kurt [AT/AT]; Quellengasse 43, A-8010 Graz (AT).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):  
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).

(71) Anmelder (nur für AU CA CN HU JP NZ RU): GENENTECH, INC. [US/US]; 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).

## (72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BIRNSTIEL, Max L. [CH/AT]; Skodagasse 14-16/15, A-1080 Wien (AT). BUSCHLE, Michael [DE/AT]; Scheimpfluggasse 10, A-1190 Wien (AT). COTTEN, Matthew [US/AT]; Maxingstrasse 22-24/3/8, A-1130 Wien (AT). MAAS, Gerhard [DE/AT]; Hyrtlstrasse 35/1/1, A-2345 Brunn am Gebirge (AT). PLANK, Christian [AT/AT]; Ungargasse 28/1/23, A-1030 Wien (AT). SCHAFFNER, Gotthold [CH/AT];

## (54) Titel: PROCESS FOR PREPARING CANCER VACCINES

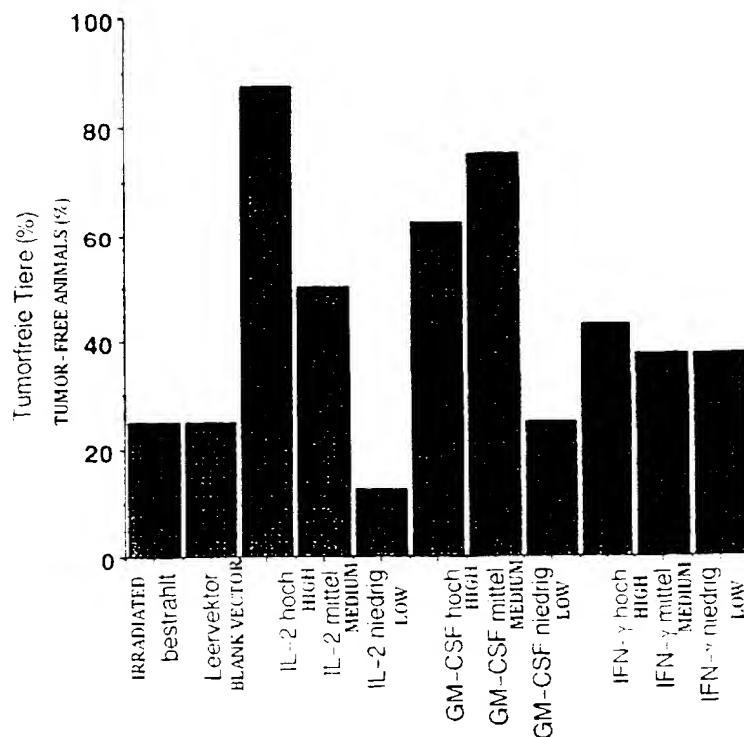
## (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON KREBSVAKZINEN

## (57) Abstract

Cancer vaccines are prepared by treating tumor cells or fibroblasts with a complex of immunostimulating polypeptide-coding DNA and of DNA-binding substance, for example polylysine, preferably conjugated with transferrine. The complex further contains a conjugate of DNA-binding substance and of an endosomolytic peptide or an adenovirus having at least one E4 defect or one Ela defect associated with other genetic defects.

## (57) Zusammenfassung

Krebsvakzine werden erhalten durch Behandlung von Tumorzellen oder Fibroblasten mit einem Komplex aus DNA, kodierend für ein immunstimulierendes Polypeptid, und einer DNA-bindenden Substanz, z.B. Polylysin, die vorzugsweise mit Transferrin konjugiert ist. Der Komplex enthält ferner ein Konjugat aus DNA-bindender Substanz und einem endosomolytischen Peptid oder einem Adenovirus, das zumindest einen E4-Defekt oder einen Ela-Defekt in Kombination mit weiteren Gendefekten aufweist.



#### *LEDIGLICH ZUR INFORMATION*

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Oesterreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## Verfahren zur Herstellung von Krebsvakzinen

Die Erfindung bezieht sich auf die Gentherapie, insbesondere auf ihre Anwendung im Rahmen der Krebstherapie.

In den letzten 20 Jahren hat es keinen entscheidenden Durchbruch bei der Behandlung von Krebserkrankungen gegeben, erst der kürzlich entwickelte Ansatz der sog. "Krebsvakzine" hat die Hoffnung auf einen Fortschritt in der Krebstherapie geweckt.

In Krebspatienten hat das Immunsystem einen großen Einfluß auf die Entwicklung des Tumors und auf die Prognose der Krankheit. Im Patienten mit malignem Melanom kann die Immunantwort zu einer vollständigen Rückbildung des Tumors in 0.5 % der Patienten führen. In den meisten Patienten wird hingegen eine Immunantwort, die die Tumorentwicklung kontrolliert, jedoch nicht alle Krebszellen ausschalten kann, in frühen Stadien des Tumors beobachtet. In fortgeschrittenen Stadien findet man oft die Situation, daß die Krebszellen der Immunerkennung entkommen oder das Immunsystem spezifisch unterdrückt wird (Hoon et al., 1990). Es wurde vorgeschlagen, nach der chirurgischen Entfernung des Primärtumors dem Patienten Krebsvakzine zu verabreichen. Krebsvakzine enthalten Krebszellen, die genetisch modifiziert sind, oder Krebszellen in Kombination mit immunstimulierenden Adjuvantien, die im Patienten eine krebsspezifische Immunantwort induzieren oder reaktivieren (s. z.B. Hoon et al., 1990; Bystryn et al., 1990 und 1992; Berd et al., 1990; Fearon et al., 1990; Lotze et al., 1992; Pardoll, 1992; Rosenberg et al., 1992, Schirrmacher, 1990).

Die Gene, mit denen Tumorzellen transfiziert werden, um sie stärker immunogen und als Folge davon weniger tumorigen zu machen, fallen in drei Kategorien:

- 1) Gene, die für Proteine kodieren, die den Tumorzellen fehlen (sog. Fremd- oder Neoantigene): Die dadurch hervorgerufene sog. "Xenogenisierung" kann z.B. durch Expression syngenetischer MHC-I-Antigene in MHC-I-defizienten Tumorzellen, durch Expression von allogenetischen MHC-I- oder MHC-II-Antigenen oder durch Expression von viralen Proteinen wie Hämaggglutinin (Itaya et al., 1987; Fearon et al., 1988; Plaksin et al., 1988 und Ostrand-Rosenberg et al., 1990).
- 2) Zytokingene: Die Expression dieser Gene (z.B. Interleukin-2, CSF = "Colony stimulating factor", Interferone) dient der Aktivierung des Immunsystems, damit dieses die Tumorzellen als fremd erkennt und sie abstößt.
- 3) Gene, die für sog. "Hilfsproteine" oder "co-stimulatorische Moleküle" kodieren: Jüngste Erkenntnisse der Immunologie haben gezeigt, daß eine effiziente Stimulierung von T-Zellen sowohl die Aktivierung des T-Zellrezeptors als auch die Aktivierung eines zweiten Rezeptors auf der T-Zelle durch ein Molekül auf der Oberfläche der Antigen präsentierenden Zelle erfordert (Jenkins und Johnson, 1993). Das Paar B7/CD28 stellt eine solche Einheit co-stimulierender Moleküle dar. Die Expression von B7 auf Melanomzellen stimuliert eine Immunabwehr von normalerweise nicht immunogenen Zellen (Baskar et al., 1993; Chen et al., 1992; Townsend und Allison, 1993, Schwartz, 1992). Das "Hitzestabile Antigen" HSA ("heat stable antigen"), das u. a. von dendritischen Zellen und von Milz-B-Zellen exprimiert wird, zeigt ebenfalls co-stimulierende Aktivität (Liu et al., 1992a und 1992b) und dürfte bei der Förderung des T-Zellwachstums mit B7 zusammenwirken. Eine der Eigenschaften von co-stimulatorischen Molekülen wie B7

dürfte darin bestehen, daß sie den Tumorzellen Eigenschaften von Antigen präsentierenden Zellen verleihen.

Mit der durch die Transfektion der Tumorzellen mit einem Gen aus einer dieser Gruppen bewirkten krebsspezifischen Immunantwort soll erreicht werden, daß nach Entfernung des Tumors Mikrometastasen, die bis heute klinisch nicht nachweisbar sind und chirurgisch nicht entfernt werden können, zerstört werden, um ein späteres Wiederauftreten von Krebs zu verhindern.

Eine Therapie auf Basis von Krebsvakzinen stellt - im Gegensatz zur unspezifischen Stimulation des Immunsystems - eine aktiv-spezifische Immuntherapie mit Impfstoffen aus inaktivierten, möglichst patienteneigenen Tumorzellen oder Teilen davon dar, wodurch das Immunsystem des Patienten gezielt gegen Antigene des individuellen Tumors oder zumindest desselben Tumortyps mobilisiert wird.

Nachdem sich gezeigt hatte, daß eine Inaktivierung der Tumorzellen eine Verminderung der Immunantwort bewirken kann, wurden in jüngster Zeit Krebsvakzine entwickelt, die aus lebensfähigen Tumorzellen bestehen (Rosenberg et al., 1992). Es ist jedoch aus Sicherheitsgründen ein Impfstoff auf der Grundlage nicht mehr teilungsfähiger Zellen erstrebenswert, die eine begrenzte Lebensdauer haben.

Einer der kritischen Schritte bei der Herstellung von Krebsvakzinen ist der Gentransfer in die Zellen, die das Vakzin bzw. einen Bestandteil davon darstellen.

Die bisher für den Transfer von Genen in die Zelle, u.a. im Rahmen der Anwendung von Krebsvakzinen, am weitesten fortgeschrittene Technik benutzt rekombinante retrovirale

Vektoren; eine solche Methode wurde kürzlich von Rosenberg et al., 1992, vorgeschlagen. Die Verwendung von Retroviren ist jedoch problematisch, weil sie, zumindest zu einem geringen Prozentsatz, die Gefahr von Nebenwirkungen, wie Infektion mit dem Virus, in sich birgt. Darüber hinaus können Retroviren nur sich teilende Zellen transduzieren. Außerdem sind diese Vektoren, wie auch die als Alternative zum retroviralen System vorgeschlagenen rekombinanten Adenoviren, Beschränkungen, und zwar hinsichtlich der Größe und Konstruktion der zu transferierenden DNA, unterworfen.

Kürzlich wurde in mehreren Arbeiten der Einsatz von nicht-rekombinanten Adenoviren aufgrund der Fähigkeit dieser Viren, den Inhalt von Endosomen freisetzen zu können, für den Gentransfer mit DNA-Komplexen mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose vorgeschlagen. Der Einsatz von Adenoviren bewirkt eine Steigerung der Effizienz des Gentransfers, indem der Abbau der in die Zelle internalisierten DNA-Komplexe in den Lysosomen vermieden wird (Curiel et al., 1991; Curiel et al., 1992a; Zatloukal et al., 1992; Cotten et al., 1992; Wagner et al., 1992; Curiel et al., 1992b). U.a. wurde vorgeschlagen, die Adenoviren durch Bindung an Polylysin zu modifizieren. Die Adenovirus-Polylysin-Konjugate können zusammen mit Konjugaten aus Transferrin-Polylysin mit DNA komplexiert werden, wobei ternäre Transferrin-Polylysin/Adenovirus-Polylysin/DNA-Komplexe entstehen (Wagner et al., 1992). Die Komplexe binden an Transferrin- und Adenovirusrezeptoren auf den Zielzellen. Nach der Endozytose bewirkt das Adenovirus den Aufbruch von Endosomen, das hat die Freisetzung des Materials vom Endosom ins Zytoplasma zur Folge. Die DNA kann daraufhin in den Zellkern eintreten, wo das Gen exprimiert wird, überwiegend von episomal lokalisierter DNA. Diese Technik hat gegenüber den konventionellen viralen und nicht-

viralen Gentransfermethoden folgende Vorteile: Da in diesem Zusammenhang das Adenovirus nur als Mittel für die Freisetzung der Transfektionskomplexe aus dem Endosom fungiert, kann das Virus mit Hilfe von genetischen und/oder chemischen, gegebenenfalls in Kombination mit physikalischen Methoden inaktiviert werden, was die Sicherheit gegenüber konventionellen viralen Techniken erhöht (Cotten et al., 1992). Ferner wird das Genkonstrukt an der Außenseite des Virus transportiert; es ist nicht Teil des Virusgenoms. Daher müssen keine viralen Vektoren hergestellt werden, und es gibt nahezu keine Beschränkungen hinsichtlich Größe und Sequenz der transportierten DNA.

Ein weiterer Vorteil des rezeptorvermittelten Gentransfers liegt in der Breite der Anwendbarkeit hinsichtlich der Zielzellen. So können Komplexe, enthaltend Transferrin- und Adenoviruskonjugate über Transferrin- und/oder Adenovirusrezeptoren aufgenommen werden können. Statt Transferrin können auch andere Liganden, spezifisch für bestimmte Zellpopulationen, verwendet werden, für Melanomzellen hat sich z.B. LDL als sehr geeignet erwiesen. Es können mit Hilfe dieses Systems hohe Werte für die Genexpression in vielen Zelltypen erhalten werden (10 - 100fach höher als für retroviral transfizierte Zellen (Lotze et al., 1992; Rosenberg et al., 1992) oder für mittels CaPO<sub>4</sub> Co-Präzipitation erhaltene stabil transfizierte Zellen (Fearon et al., 1990)). Ferner können Vielfachkopien des Genkonstrukts in die Zellen transportiert werden. Es können teilende und nicht-teilende Zellen transfiziert werden. Die Expression der in die Zelle transportierten DNA hält über mehrere Monate in konfluenten (wachstumsarrestierten) Zellkulturen an (Zatloukal et al., 1992).

Neben Adeno- und anderen Viren bzw. Virusfragmenten besitzen auch bestimmte Peptide die Eigenschaft, Endosomen aufbrechen zu können. Derartige Peptide, die auch als "endosomolytische" oder "fusogene" Peptide bezeichnet werden, wurden ebenfalls eingesetzt, um beim Gentransfer mittels rezeptorvermittelter Endozytose eine Steigerung der Genexpression herbeizuführen. Der Einsatz solcher Peptide für den Gentransfer ist in der WO 93/07283 beschrieben.

Die mit dem Adenovirus d1312 durchgeföhrten Versuche haben Toxizitätsprobleme aufgezeigt; der Replikationsdefekt des Virus, der auf einen Defekt in der E1A-Region zurückzuföhren ist, konnte von den transfizierten Zellen teilweise umgangen werden, der Defekt ist also "undicht". Darüberhinaus war die Ausbeute an Virus in den Verpackungszelllinien, die verfügbar sind, um die Defekte von Ad5 d1312 zu komplementieren, nicht befriedigend.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Krebsvakzinen auf der Grundlage eines verbesserten Gentransfersystems bereitzustellen.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung von Krebsvakzinen, die autologe Tumorzellen enthalten. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man Tumorzellen oder Fibroblasten kultiviert und die kultivierten Zellen ex vivo mit einer Zusammensetzung transfiziert, die folgende Komponenten enthält:

- ai) ein DNA-Moleköl, das eine oder mehrere in der Zelle exprimierbare Sequenzen enthält, die für ein oder mehrere, gleiche oder verschiedene, immunstimulierende Polypeptide kodieren, oder

mehrere DNA-Moleküle, enthaltend für verschiedene immunstimulierende Polypeptide kodierende Sequenzen,

- a ii) gegebenenfalls ein weiteres DNA-Molekül, das frei ist von Sequenzen, die für ein in der zu transfizierenden Zelle funktionell aktives Polypeptid kodiert;
- b) ein Konjugat zwischen einem DNA-bindenden Molekül und einem endosomolytisch wirkenden Mittel, ausgewählt aus der Gruppe
  - i) Adenovirus, das eine Mutation zumindest in der E4-Region aufweist,
  - ii) Adenovirus, das neben einem Effekt in der E1A-Region einen oder mehrere weitere genetische Defekte aufweist, oder
  - iii) endosomolytisch wirkendes Peptid;
- c) gegebenfalls

c) ein DNA-bindendes Molekül, vorzugsweise konjugiert mit einem Internalisierungsfaktor, der an ein Oberflächenmolekül der zu transfizierenden Zellen bindet und in diese internalisiert wird,

wobei die Komponenten b) und c) mit der in a) definierten DNA einen im wesentlichen elektroneutralen Komplex bilden, daß man die transfizierten Zellen derart inaktiviert, daß sie unter Beibehaltung ihrer Fähigkeit zur Expression der in ai) definierten DNA ihre Fähigkeit zur Teilung verlieren, wobei man im Falle der Transfektion von Fibroblasten diese mit nicht-transfizierten sowie inaktivierten Tumorzellen mischt, und daß man die Zellpopulation gegebenenfalls mit pharmazeutisch annehmbaren Hilfs- und Trägerstoffen mischt.

Das in b) definierte Konjugat wird im folgenden als "endosomolytisches Konjugat" bezeichnet.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Krebsvakzine enthalten gegenüber den von Rosenberg et al., 1992, vorgeschlagenen Krebsvakzinen inaktivierte Tumorzellen, die überraschenderweise trotz der Bestrahlung hinsichtlich der von ihnen ausgelösten Immunantwort voll wirksam sind. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß aufgrund der hohen Expressionsraten der immunstimulierenden Gene in den transfizierten Zellen eine durch die Inaktivierung der Zellen bewirkte Verminderung bzw. einen Verlust der Antigenizität zumindest teilweise kompensiert wird.

Als Ausgangsmaterial für Tumorvakzine, die individuell für jeden einzelnen Patienten hergestellt werden, dienen autologe Tumorzellen, gegebenenfalls in Mischung mit Fibroblasten. Die Fibroblasten können ebenfalls autologe Zellen sein, es ist aber auch möglich, Zellen einer Fibroblastenzelllinie einzusetzen, wodurch die Notwendigkeit wegfällt, in jedem einzelnen Fall eine individuelle Fibroblastenkultur herstellen zu müssen, was mehrere Wochen erfordert.

Zunächst werden Tumorzellen und/oder Fibroblasten aus Gewebsproben des zu behandelnden Individuums isoliert. Die Methoden dazu sind dem Fachmann bekannt. Primäre Melanomzellen können z. B. am einfachsten aus Lymphknotenmetastasen isoliert werden, indem die Metastasen chirurgisch entfernt und unter sterilen Bedingungen mechanisch und gegebenenfalls zusätzlich enzymatisch dissoziiert werden.

Die Isolierung aus Primärtumoren ist im allgemeinen schwieriger, vor allem im Fall von kleineren Tumoren.

Dabei wird beispielsweise im Fall von Melanomen so vorgegangen, daß die Tumore chirurgisch entfernt, mechanisch zerkleinert und zusätzlich enzymatisch dissoziiert werden. Bekannte Vorschriften für die Dissozierung, nach denen vorgegangen werden kann, wenden Collagenase, DNase und Hyaluronidase an.

Die Isolierung aus anderen Tumoren kann nach demselben Prinzip erfolgen, in Abhängigkeit vom umgebenden Gewebe werden die Methoden zur Isolierung und Dissozierung variiert. Für Isolierung und Kultur von Tumorzellen können literaturbekannte Methoden angewendet werden, wie sie z.B. dem Fachbuch "Human Cancer in Primary Culture", Hsg. John R.W. Masters, 1991, entnehmbar sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die Genkonstrukte statt in Krebszellen in primäre Fibroblasten eingebracht, die dann mit den nicht-transfizierten bestrahlten Krebszellen, die Tumorantigene tragen, vermischt werden (Fakhrai et al., 1992). Der Vorteil dieser Ausführungsform besteht darin, daß Fibroblasten leicht und in großen Mengen vom Patienten erhalten werden können, was vor allem von Bedeutung ist, wenn kleinere Tumore vorliegen und damit eine geringere Zahl von Tumorzellen vorhanden ist, und daß der Gentransfer in autologe primäre Fibroblasten leichter standardisiert werden kann als die Transfektion in primäre Krebszellisolate von verschiedenen Patienten. Ein weiterer Vorteil dieser Ausführungsform besteht darin, daß die Tumorzellen nicht über längere Zeit kultiviert werden müssen, womit ihr antigenes Spektrum, das durch die Kultivierung teilweise verloren gehen kann, erhalten bleibt. Damit wird außerdem der mit der Kultivierung von Tumorzellen verbundene Nachteil vermieden, daß einzelne Populationen, z.B. Fibroblasten, die im Tumorisolat zu

einem geringen Anteil enthalten sind, oder Tumorzellklone die Kultur überwachsen.

Fibroblasten werden nach bekannten Methoden aus Hautbiopsien isoliert und kultiviert. Derartige Methoden wurden z.B. von Jones, 1989; Freshney, 1987; und Sly und Grubb, 1979, beschrieben

Nach der Kultivierung werden die Zellen mit dem Transfektionsmedium, das die Komplexe mit den Komponenten a) bis c) enthält, behandelt. Im allgemeinen wird eine gleichzeitige Verabreichung von Konjugat b) und dem Komplex zwischen DNA und Internalisierungsfaktor-Konjugat bevorzugt. Um die Genexpression zu verstärken, können die Komplexe auch wiederholt angewendet werden.

Nach der Transfektion werden die Zellen von überschüssigem Medium, das Transfektionskomplexe beinhaltet, befreit, mit frischem Kulturmedium gewaschen und beliebig weiter kultiviert.

Die Inaktivierung der Tumorzellen bzw. der Fibroblasten, die vorzugsweise in gleicher Weise wie die transfizierten Fibroblasten inaktiviert werden, kann mit an sich bekannten Methoden, z.B. physikalischen Methoden, wie Behandlung mittels Röntgen- oder Gammastrahlung, und/oder mittels chemischer Behandlung mit Mitosehemmern, z.B. mit Mitomycin C, erfolgen. Geeignet sind Substanzen, die die DNA-Replikation blockieren oder sog. "Spindelgifte", das sind Substanzen, die die Mitosespindel hemmen.

Die geeignete Inaktivierungsdosis kann ermittelt werden, indem z.B. bei verschiedenen Strahlendosierungen bzw. Konzentrationen des chemischen Inaktivierungsmittels und/oder unterschiedlicher Behandlungsdauer einerseits der  $^{3}\text{H}$ -Thymidineinbau in die Zellen oder ihre

Proliferationsrate und andererseits die Expression des Fremdgens bestimmt wird.

Durch die Bestrahlung der transfizierten Zellen und ihrer damit begrenzten Lebenszeit werden etwaige Langzeitnebenwirkungen vermindert. Es wird eine temporäre, durch die Gendosis festgelegte, zeitlich begrenzte Genexpression erzielt. Im Zuge der durchgeföhrten Versuche wurde festgestellt, daß eine Gammastrahlendosis bis zu 100 Gy die Expression der transfizierten Genkonstrukte nicht verhindert.

Vorzugsweise werden die transfizierten Fibroblasten ebenfalls inaktiviert. Mit dieser Maßnahme wird eine bei der Transfektion und/oder Kultur etwa erworbene Tumorigenität ausgeschaltet.

In dem Verfahren zur Herstellung der Krebsvakzine wird bevorzugt ein Einfrieren der Zellen unter kontrollierten Bedingungen und unter Zusatz von Substanzen, die Gefrierschäden an den Zellen vermeiden ("kryoprotectants"), z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), als Zwischenschritt eingeschaltet. Der Gefrierschritt kann prinzipiell an beliebiger Stelle des Verfahrens vorgesehen sein, z.B. vor der Transfektion der kultivierten Zellen, oder auch nach der Transfektion, ein Einfrieren ist aber auch als letzter Schritt, also nach der Bestrahlung der Zellen und unmittelbar vor der Verabreichung des Vakzins, möglich. Durch das Einfrieren wird ein Vorrat an für die Transfektion bereiten bzw. bereits transfizierten Zellen verfügbar, der dann in Aliquots die Fertigstellung der Tumorvakzine erleichtert. Zweckmäßig ist ein Gefrierpräparat, das zwischengelagert werden kann und vor der Anwendung nur noch einer Aufbereitung, gegebenenfalls einschließlich Bestrahlung, unterzogen werden muß.

Es ist in jedem Fall erforderlich, vor der Verabreichung der Tumorvakzine die Zellen von Gefrierschutzzusätzen zu reinigen.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren *in vitro* hergestellten Krebsvakzine werden dem Patienten verabreicht, um eine systemische, tumorspezifische Immunantwort auszulösen oder zu reaktivieren.

Die Menge an Tumorzellen pro Immunisierung liegt im Größenordnungsbereich von  $10^5$  -  $10^7$  Zellen. Für die Ausführungsform, in der Fibroblasten kultiviert und transfiziert werden, liegt die Zahl an beigemischten Fibroblasten etwa in demselben Bereich, kann jedoch gegebenenfalls bis zu ca. 1/100 der Zellzahl verringert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde in einem Mausmodell untersucht, wie lange nach der Injektion von gentechnisch veränderten Melanomzellen, den Krebsvakzinen, diese Zellen an der Injektionsstelle nachweisbar sind. Ferner wurde untersucht, ob es zu einer Verteilung dieser Zellen im Blut oder in verschiedenen Organen kommt. Der Nachweis wurde anhand von Polymerase Ketten Reaktionen durchgeführt. Bei der Aufbereitung der Krebsvakzine wurden die Zellen mit Interleukin-2 Plasmid-DNA transfiziert. Mit spezifischen Primern wurden IL-2- und Adenovirus-DNA Fragmente als Marker für die gentechnisch veränderten Melanomzellen aus den verschiedenen Gewebeproben detektiert.

Die Untersuchungen an der Immunisierungsstelle zeigten, daß die verabreichten, aus gentechnisch veränderten Melanomzellen bestehenden Krebsvakzine nach der Injektion innerhalb weniger Tage eliminiert wurden. In der akuten

Phase des Zellabbaus, 2 Tage nach der Immunisierung, wurde gezeigt, daß keine Übertragung der rekombinanten IL-2 DNA oder Adenovirus DNA auf das Blut, Körperorgane oder in die Keimzellen erfolgte.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Transfektionskomplexe, bestehend aus DNA, enthaltend eine oder mehrere für ein immunstimulierendes Polypeptid kodierende Sequenzen, einem DNA-bindenden Molekül, das vorzugsweise mit einem Internalisierungsfaktor für Tumorzellen und/oder Fibroblasten konjugiert ist, insbesondere Polylysin, und einem endosomolytischen Konjugat aus einem DNA-bindenden Molekül und dem oben definierten Adenovirus oder einem Peptid, wobei das DNA-bindende Molekül c) und der DNA-bindende Anteil des Konjugats b) an die DNA gebunden sind.

Es wurde festgestellt, daß mit Hilfe der erfindungsgemäßen Komplexe ein effizienter Gentransfer in primäre humane Melanomzellen und primäre humane Fibroblasten möglich ist, daß transfizierte Mausmelanomzellen bis zu 24.000 Einheiten IL-2 pro  $1 \times 10^6$  Zellen pro 24 h produzierten, was mindestens 30 x mehr ist als die Werte, die mit anderen viralen (Lotze et al., 1992; Rosenberg et al., 1992) oder nicht-viralen (Fearon et al., 1990) Gentransfertechniken erhalten wurden, daß eine Bestrahlung von bis zu 100 Gy die Expression der transfizierten Genkonstrukte nicht vermindert. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde in einem Mausmodell die Wirkung eines Maus-Melanomvakzins gezeigt, das eine systemische Immunantwort in immunisierten Mäusen induziert und die Tiere nach Verabreichung von tumorigenen Dosen von Melanomzellen vor einer Entwicklung von Tumoren schützt. Ferner konnte im Tiermodell die Wirksamkeit eines Melanomvakzins gegen Metastasenbildung gezeigt werden.

Das DNA-Molekül, definiert als Komponente ai), ist ein Plasmid, das eine für ein immunstimulierendes Polypeptid, beispielsweise ein Zytokin, kodierende Sequenz in exprimierbarer Form enthält. Unter "immunstimulierend" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch die die Immunantwort verstärkende Eigenschaft der sog. co-stimulierenden Moleküle ("co-stimulatory molecules"), wie B7 (Schwartz, 1992; Townsend und Allison, 1993) oder Adhäsionsmoleküle, z.B. HSAs ("heat stable antigens", Kay et al., 1990) oder ICAM (Springer et al., 1987) verstanden; ferner zählen zu immunstimulierenden Substanzen auch Fremdantigene (sog. "Neo-Antigene"), z.B. virale Antigene. Die für das immunstimulierende Polypeptid kodierende Sequenz steht in Verbindung mit regulatorischen Sequenzen, die eine möglichst hohe Expression des immunmodulatorischen Polypeptids in den Zielzellen ermöglichen. Vorzugsweise werden starke Promotoren wie der CMV-Promotor (Boshart et al., 1985) oder der B-Aktin-Promotor (Gunning et al., 1987) verwendet. Das geeignete Konstrukt kann in Vorversuchen durch Vergleich der Expressionswerte ermittelt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die für Interleukin 2 (IL-2) kodierende Sequenz verwendet.

Es können jedoch auch für andere Zytokine wie IL-4, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF kodierende DNA-Sequenzen eingesetzt werden (Pardoll, 1992). Es können auch Kombinationen von Zytokinsequenzen eingesetzt werden, um die immunstimulierende Wirkung zu verstärken, z.B. IL-2 + IFN- $\gamma$ , IL-2 + IL-4, IL-2 + TNF- $\alpha$  oder TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$ . Vorzugsweise liegen die für zwei verschiedene Zytokine kodierenden Sequenzen auf getrennten Plasmiden vor. Damit kann, wie z.B. in den erfindungsgemäß durchgeführten

Experimenten anhand von IL-2 und IFN- $\gamma$  gezeigt wurde, eine Feinabstufung der Zytokinexpression erhalten werden, indem die Mengenverhältnisse der beiden Plasmide variiert werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein DNA-Molekül eingesetzt, das eine oder mehrere für ein co-stimulatorisches Molekül kodierende Sequenz(en) enthält. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das co-stimulatorische Molekül das Hitzestabile Antigen (Heat Stable Antigen HSA). Eine die für HSA kodierende Sequenz enthaltende DNA kann sowohl allein als auch in Kombination mit einer für ein Zytokin, vorzugsweise IL-2, kodierenden DNA eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein DNA-Molekül eingesetzt, das eine oder mehrere für ein Neoantigen kodierende Sequenz(en) enthält. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Neoantigen ein Virusprotein oder ein Fragment davon, beispielsweise das Rabies-Glykoprotein. Eine die für das Virusprotein kodierende Sequenz enthaltende DNA kann sowohl allein als auch in Kombination mit einer für ein Zytokin, vorzugsweise IL-2, kodierenden DNA eingesetzt werden.

Hinsichtlich der Größe des DNA-Konstrukts gibt es praktisch keine Limitierung, das zur Anwendung kommende Gentransfersystem hat sich für Konstrukte einer Größe von 48 kb als geeignet erwiesen (Cotten et al., 1992).

Gegebenenfalls liegt die für ein immunstimulierendes Polypeptid kodierende DNA, also die therapeutisch wirksame DNA, in Mischung mit einem in aii) definierten DNA-Molekül vor, das als "Füll-DNA" dient. Die Sequenz dieser DNA ist nicht kritisch, sie muß - neben den Anforderungen an die Reinheit, hinsichtlich derer sie der

therapeutisch wirksamen DNA entsprechen muß - lediglich die Bedingung erfüllen, daß sie keine Sequenz enthält, die für ein in der Zelle funktionell aktives Polypeptid kodiert. Die Größe dieser DNA ist ebenfalls nicht kritisch, im allgemeinen ist es zweckmäßig, daß sie im Bereich der Größenordnung des gentherapeutisch wirksamen DNA-Moleküls liegt bzw. kleiner ist als diese.

Diese Füll-DNA kann, ausgehend von einer konstanten DNA-Menge im Hinblick auf ein definiertes Verhältnis der übrigen Komplexpartner, verschieden große Anteile der therapeutisch wirksamen DNA ersetzen. Dies hat den Vorteil, daß man die therapeutische DNA-Dosis und damit die in der Zelle exprimierte Zytokinmenge variieren kann, ohne die anderen Parameter verändern zu müssen, was im Rahmen eines standardisierten Tumorzinkinherstellungsprozesses von großem Interesse ist. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß die Menge des in der Zelle exprimierten Gens proportional zum Anteil an Füll-DNA abnimmt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die verwendete Plasmid-DNA frei von Lipopolysacchariden. Es wurde überraschend festgestellt, daß die Expressionswerte beträchtlich erhöht sind, wenn die Plasmid-DNA weitestgehend frei ist von Lipopolysacchariden. Diese stellen eine häufige Verunreinigung von Plasmid-DNA dar, die im allgemeinen in E.coli propagiert wird. Um eine Entfernung von Lipopolysacchariden zu erzielen, kann entweder die DNA mit geeigneten Methoden gereinigt werden, z.B durch eine Kombination chromatographischer Methoden einschließlich Polymyxin-Chromatographie, oder es können, um auch Lipopolysaccharide zu erfassen, die gegebenenfalls aus dem Medium stammen, dem Transfektionsmedium

Lipopolysaccharid-bindende Reagentien wie Polymyxin zugesetzt werden.

Wenn die Zielzelle Rezeptoren für das Adenovirus aufweist, durch die eine Internalisierung in einem für die effiziente Expression der Fremd-DNA in der Zelle ausreichendem Maß gewährleistet, kann es im Fall der Verwendung von Adenoviruskonjugaten als Komponente b) genügen, als Komponente c) ein nicht mit einem weiteren Internalisierungsfaktor konjugiertes DNA-bindendes Molekül einzusetzen; im allgemeinen handelt es sich dabei um dasselbe Molekül wie das im Konjugat b) enthaltene, vorzugsweise wird Polylysin verwendet. Für diese Ausführungsform der Erfindung hat das Adenovirus selbst die Funktion des Internalisierungsfaktors, es ist in diesem Fall nicht erforderlich, die DNA-bindende Substanz mit einem weiteren Internalisierungsfaktor zu konjugieren.

Die DNA ist in der Ausführungsform der Erfindung, in der c) eine nicht-konjugierte DNA-bindende Substanz ist, mit dem Konjugat b) komplexiert; die Komponente c) hat in diesem Fall in erster Linie die Funktion, eine Kompaktierung und damit eine erleichterte Aufnahme der Komplexe in die Zelle zu bewirken (Wagner et al., 1991a). Für bestimmte Anwendungsfälle, z. B. bei Verwendung kleiner DNA-Moleküle, kann ein nicht-konjugiertes DNA-bindendes Molekül als Komponente c) gänzlich entfallen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die als Komponente c) definierte DNA-bindende Substanz mit einem Internalisierungsfaktor konjugiert. Diese Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kommt vor allem dann zur Anwendung, wenn, im Fall der Verwendung eines Adenoviruskonjugats, die Zielzelle keine oder nur wenige Rezeptoren für das Adenovirus aufweist, z.B. bei

Verwendung eines Virus einer entfernten Spezies, oder wenn als endosomolytisches Konjugat b) ein Peptidkonjugat eingesetzt wird. In Gegenwart eines weiteren Internalisierungsfaktor-Konjugats profitieren die Virus-Konjugate von der Internalisierungsfähigkeit des Konjugats c), indem sie gemeinsam mit diesem an die Nukleinsäure komplexiert werden und als Bestandteil des so entstandenen Komplexes, im folgenden als "Kombinations-Komplex" oder "ternärer Komplex" bezeichnet, in die Zelle aufgenommen werden. Ohne auf diese Theorie festgelegt sein zu wollen, werden die Kombinations-Komplexe von Zellen entweder durch Bindung an den für den Internalisierungsfaktor spezifischen Oberflächenrezeptor oder durch Bindung an den Virusrezeptor oder durch Bindung an beide Rezeptoren über den Weg der Rezeptor-vermittelten Endozytose aufgenommen. Bei der Freisetzung der Viren aus den Endosomen wird auch die in den Komplexen enthaltene DNA in das Zytoplasma freigesetzt und entkommt dadurch dem lysosomalen Abbau.

Die als c) bevorzugt enthaltenen Konjugate zwischen einem Internalisierungsfaktor und einer DNA-bindenden Substanz sind an sich bekannt.

Unter Internalisierungsfaktor sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung Liganden oder Fragmente davon zu verstehen, die nach Bindung an eine Tumorzelle oder einen Fibroblasten über Endozytose, vorzugsweise Rezeptor-vermittelte Endozytose, internalisiert werden, oder Faktoren, deren Bindung/Internalisierung über Fusion mit Zellmembranelementen erfolgt.

Beispiele für Internalisierungsfaktoren sind die Liganden Transferrin (Klausner et al., 1983), Asialoglykoproteine (wie Asialotransferrin, Asialorosomucoid oder Asialofetuin), (Ashwell et al., 1982), Lectine

(Goldstein et al., 1980; Sharon, 1987), bzw. Substanzen, die Galaktose enthalten und über den Asialoglykoproteinrezeptor internalisiert werden; mannosylierte Glykoproteine (Stahl et al., 1978), lysosomale Enzyme (Sly et al., 1982), LDL (Goldstein et al., 1982), modifizierter LDL (Goldstein et al., 1979), Lipoproteine, die über Rezeptoren in die Zelle aufgenommen werden (apo B100/LDL); virale Proteine; Antikörper (Mellman et al., 1984; Kuhn et al., 1982; Abrahamson et al., 1981) bzw. Fragmente davon gegen Zelloberflächenantigene, z.B. anti-CD4, anti-CD7, anti-CD3; Zytokine wie Interleukin-1 (Mizel et al., 1987), Interleukin-2 (Smith et al., 1985), TNF (Imamura et al., 1987), Interferone (Anderson et al., 1982); CSF ("Colony-stimulating Factor"), (Walker et al., 1987), Faktoren und Wachstumsfaktoren wie Insulin (Marshall, 1985), EGF ("Epidermal Growth Factor"), (Carpenter, 1984); PDGF ("Platelet-Derived Growth Factor"), (Heldin et al., 1982), TGF $\alpha$  (Massague et al., 1986) und TGF $\beta$  ("Transforming Growth Factors"  $\alpha$ ,  $\beta$ ), HGF (Hepatocyte Growth Factor (Nakamura et al., 1989), Nervenwachstumsfaktor (Hosang et al., 1987), Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I ("Insulin-like Growth Factor"), (Schalch et al., 1986), LH, FSH (Ascoli et al., 1978), Wachstumshormon (Hizuka et al., 1981), Prolactin (Posner et al., 1982), Glucagon (Asada-Kubota et al., 1983), Thyroidhormone (Cheng et al., 1980),  $\alpha$ -2-Makroglobulin-Protease (Kaplan et al., 1979). Weitere Beispiele sind Immunglobuline oder Fragmente davon als Liganden für den Fc-Rezeptor oder Anti-Immunglobulin-Antikörper, die an sIgs ("Surface Immunoglobulins") binden. Die Liganden können natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein (siehe Trends Pharmacol. Sci., 1989, und die darin zitierten Referenzen).

Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind als Internalisierungsfaktor Transferrin und EGF.

Geeignete DNA-bindende Substanzen als Komponente c) (nicht-konjugiert oder als Konjugatbestandteil eines Internalisierungsfaktorkonjugats) bzw. als Bestandteil des Konjugats b) sind z.B. homologe organische Polykationen wie Polylysin, Polyarginin, Polyornithin oder heterologe Polykationen mit zwei oder mehr unterschiedlichen positiv geladenen Aminosäuren, wobei diese Polykationen verschiedene Kettenlänge aufweisen können, ferner nicht-peptidische synthetische Polykationen wie Polyethylenimin. Geeignete DNA-bindende Substanzen sind ferner natürliche DNA-bindende Proteine polykationischen Charakters wie Histone oder Protamine bzw. Analoge oder Fragmente davon, sowie Spermin oder Spermidine.

Die Länge des Polykations ist nicht kritisch, sofern die Komplexe im wesentlichen elektroneutral sind. Wenn die DNA aus 6.000 bp und 12.000 negativen Ladungen besteht, kann die Menge an Polykation pro Mol DNA z.B. sein:

60 Mol Polylysin 200 oder  
30 Mol Polylysin 400 oder  
120 Mol Polylysin 100, etc.

Der Durchschnittsfachmann kann mittels einfacher Routineversuche andere Kombinationen von Polykationlänge und molarer Menge auswählen.

Bevorzugt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung Polylysin eingesetzt, insbesondere mit einer Kettenlänge von ca. 200 bis 300 Lysinen.

Wenn zur Herstellung der Konjugate b) das DNA-bindende Molekül im Hinblick auf die Kopplung an das

endosomolytische Mittel, insbesondere das Virus, modifiziert wird, z.B. wenn Polylysin mit Streptavidin konjugiert wird, um an biotinyliertes Adenovirus gebunden zu werden, kann der Einfachheit halber das derart modifizierte DNA-bindende Molekül als Komponente c) eingesetzt werden. Das bedeutet in der Praxis, daß bei der Herstellung von Polylysin-Streptavidin/Biotin-Adenovirus-Konjugaten ein Überschuß an Polylysin-Streptavidin eingesetzt wird, der die Funktion der Komponente c) übernimmt.

Die Internalisierungsfaktor-Polykation-Konjugate können auf chemischem oder, falls das Polykation ein Polypeptid ist, auf rekombinantem Weg hergestellt werden, bezüglich der Herstellungsmethoden wird auf die Offenbarung der EP 388 758 Bezug genommen.

Die Konjugate können auch nach der von Wagner et al., 1991b, beschriebenen Methode hergestellt werden, indem ein Glykoprotein, z.B. Transferrin, und das DNA-bindende Molekül, insbesondere Polylysin, über eine oder mehrere Kohlenhydratketten des Glykoproteins miteinander verbunden werden.

Bevorzugt enthält ein Adenoviruskonjugat b) ein Adenovirus mit einem Defekt in der E4-Region. Derartige Adenoviren wurden von Bridge und Ketner, 1989, beschrieben. Die Funktion der in der komplexen E4-Region kodierten Proteine ist erst teilweise aufgeklärt. Bisher ist bekannt, daß die E4-Region, wie die Elb-Region, für den Übergang zwischen dem frühen und dem späten Genexpressionsprogramm des Virus und für das Abschalten der Wirtsproteinsynthese wesentlich ist, ferner für die Virusreplikation und den Virionzusammenbau. Es gibt 24 E4-mRNAs, bisher wurden sieben offene Leserahmen identifiziert, wobei angenommen wird, daß die Leserahmen

3 und 6 in erster Linie für den E4-Phänotyp verantwortlich sein dürften. Eine sehr wichtige Funktion hat das Genprodukt des offenen Leserahmens ORF 6/7. Dieses Protein bindet wahrscheinlich den zellulären Transkriptionsfaktor E2F, womit er zum hochspezifischen adenoviralen Transkriptionsfaktor wird. Es wurde überraschend festgestellt, daß ein Adenovirus, das einen Defekt in der E4-Region hat, als Bestandteil eines Gentransfersystems auf der Grundlage der Rezeptor-vermittelten Endozytose, bei dem das Adenovirus die Funktion eines die Endosomen aufbrechenden Mittels hat, bei der Anwendung auf Tumorzellen geringe Toxizität bei gleichzeitig hoher Gentransporteffizienz aufweist.

Aus den von Bridge und Ketner beschriebenen Adenoviren wurde die Mutante dl1014, die einen intakten ORF 4 besitzt, in der jedoch ORF 3 und ORF 6 sowie ORF 6/7 defekt sind, aufgrund ihrer Eigenschaft ausgewählt, daß sie in der Synthese viraler Proteine am stärksten beeinträchtigt ist. Da die Funktionen der in E4 kodierten Virusproteine noch nicht zur Gänze aufgeklärt sind, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht definiert werden, in welchen Leserahmen die Mutationen gesetzt werden müssen, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Weitere außer der Mutante dl1014 geeignete Mutanten können empirisch ermittelt werden, indem E4-Mutanten, wie von Bridge und Ketner beschrieben, hergestellt und in standardisierten Transfektions- und Zytotoxizitätsexperimenten, wie sie in den Beispielen beschrieben sind, getestet werden. Für die orientierenden Transfektionstests kann zunächst statt des Zytokingens ein Reportergen verwendet werden. Mutanten, die vergleichbare Genexpressions- und Zytotoxizitätswerte bringen wie dl1014 bzw. dl1014 sogar überlegen sind, sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Bestandteile des Transfektionskomplexes geeignet, sofern sie ferner die Anforderung erfüllen, daß die Viren, wie z.B. dl1014 in

der Zelllinie W162, in einer den E4-Defekt komplementierenden Zelllinie zu hohen Titern gezüchtet werden können.

Alternativ zum Adenovirus mit einem E4-Defekt kann auch ein Adenovirus mit einem Defekt in der Ela-Region eingesetzt werden, das zusätzlich zu dem Ela-Defekt einen oder mehrere weitere Gendefekte aufweist, der/die mit chemischen, chemisch/physikalischen oder genetischen Methoden gesetzt wurde(n).

Die mit Hilfe von chemischen oder physikalisch/chemischen Methoden gesetzten Defekte sind keine gezielten Defekte, sondern können über das ganze Virusgenom verstreut sein.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung hat sich u.a. eine Adenovirus-Mutante der Bezeichnung dl312 (Jones und Shenk, 1979), die mit 8-Methoxypsoralen/UV inaktiviert worden war, als für die Herstellung von Krebsvakzinen geeignet gezeigt.

Andere geeignete Ela-Mutanten können nach literaturbekannten Methoden hergestellt, zusätzlich mit verschiedenen Inaktivierungsmethoden und/oder -dosen behandelt und, wie für E4-Mutanten beschrieben, ihre Eignung zur Herstellung von Tumorvakzinen als Bestandteil der Transfektionskomplexe getestet werden.

Alternativ zu 8-Methoxypsoralen können andere Psoralenderivate eingesetzt werden, z.B. 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen, von dem festgestellt wurde, daß es sich für die Inaktivierung von Adenoviren im Hinblick auf deren Anwendung für den Gentransfer eignet. (Psoralenderivate haben die Fähigkeit, in die DNA interkalieren zu können und nach Bestrahlung mit UV von 365 nm kovalente Interstrang- und Intrastrang-Addukte mit

der Virus-DNA zu bilden (Hanson, 1992). Diese Addukte inaktivieren die betroffenen Genabschnitte und blockieren dadurch die Genfunktionen, z.B. die Virustranskription und -replikation.) Es wurde festgestellt, daß einer Reduktion der Virusreplikation um mehr als 5 log (bestimmt mittels CPE-Assay) und einer Reduktion der Virusreplikation um mehr als 7 log (bestimmt mittels Plaque-Assay) einer Reduktion der Gentransferverstärkung um nur eine halbe Zehnerpotenz gegenübersteht (Cotten et al., 1992).

Im Hinblick auf die bei der Herstellung von Arzneimitteln generell und bei der Herstellung von Tumorvakzinen im besonderen angestrebte größtmögliche Standardisierbarkeit, die sich auf alle Komponenten bzw. Verfahrensparameter erstreckt, also auch auf die eingesetzten Viren, wird vorteilhafterweise ein Virus eingesetzt, das möglichst nach einer standardisierbaren Methode inaktiviert wurde. Die Anforderung an die Standardisierbarkeit wird vor allem von chemischen Inaktivierungsmethoden erfüllt, die diesbezüglich den chemisch/physikalischen Methoden überlegen sind. Ein Beispiel für eine chemische Inaktivierungsmethode ist die Inaktivierung mit  $\beta$ -Propiolacton (Morgeaux et al., 1993; De Shu et al., 1986; Budowsky und Zalesskaya, 1991). Diese Methode hat den Vorteil, daß aufgrund der Instabilität des Inaktivierungsmittels in wässrigen Lösungen eine Reinigung von nicht-reagiertem Reagens entfällt. Außerdem erfordert diese Inaktivierungsmethode keine UV-Behandlung, was im Hinblick auf Standardisierbarkeit ebenfalls vorteilhaft ist. Es wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, daß die Behandlung von Adenovirus mit zwei Aliquots 0.3 %  $\beta$ -Propiolacton während 4 h bei Raumtemperatur einen Abfall des Virustiters um 5 log hervorruft, was mit der mittels 8-Methoxypsoralen erzielten Inaktivierung

vergleichbar ist. Die DNA-Transportaktivität wird bei mittleren Dosen von  $\beta$ -Propiolacton (0.3 %) beibehalten, während die Behandlung mit 1 %  $\beta$ -Propiolacton einen beträchtlichen Rückgang dieser Fähigkeit hervorruft. Die Analyse der Genexpression vom inaktivierten Virus zeigte, daß sowohl die Psoralenderivate als auch  $\beta$ -Propiolacton die Virusgenexpression (E1a und E3) im selben Ausmaß blockieren. Der empfindlichere Plaque-Assay erwies jedoch, daß die Psoralenbehandlung das Virus um mehr als 7 log inaktiviert, wobei bei den höchsten Virusdosen keine Plaques beobachtet wurden. Im Gegensatz dazu rief  $\beta$ -Propiolacton-Inaktivierung nur einen Abfall im Virustiter um 5 log hervor, wobei bei höheren Virusdosen Plaques beobachtbar waren.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird somit ein Virus eingesetzt, das mittels ausschließlich chemischer Methoden inaktiviert ist, vorzugsweise mittels  $\beta$ -Propiolacton.

Die Eignung einer Methode zur Inaktivierung von Viren im Hinblick deren Verwendung für den Gentransfer, insbesondere für die erfindungsgemäßen Tumorvakzine, kann in Vorversuchen, wie sie in den Beispielen für die Inaktivierung von Adenoviren mit 8-Methoxypsoralen/UV, 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen/UV und  $\beta$ -Propiolacton illustriert sind, ermittelt werden. Dabei wird z.B. die Effizienz der Virusinaktivierung durch Bestimmung des Virustiters und/oder mittels des empfindlicheren Plaque-Assays bestimmt und darüberhinaus die Fähigkeit des Virus zur Verstärkung des Rezeptor-vermittelten Gentransfers anhand eines Reportergens getestet. Um festzustellen, wo am Virusgenom die Inaktivierungsmethode greift, d.h. welche Abschnitte zerstört werden, können mit DNA-Sonden Hybridisierungsversuche durchgeführt werden, mit denen

die Viren auf das Vorhandensein der entsprechenden Transkripte untersucht werden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden nach diesem Prinzip mehrere Inaktivierungsmethoden daraufhin getestet, ob sie die Virusreplikations- und Transkriptionsfunktionen zu blockieren vermögen. Geeignet ist eine Inaktivierungsmethode dann, wenn sie Adenoviruspartikel liefert, die die für die DNA-Transportfunktion nützliche endosomolytische Aktivität, die eine Funktion des Viruskapsids ist, noch besitzen, während ihnen die Fähigkeit zur Virusgenexpression oder Replikation, welche unerwünschte Veränderungen in der Zelle hervorrufen könnten, fehlt. Es wurde festgestellt, daß die Behandlung von Adenovirus mit 8-Methoxypsoralen oder mit 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen, jeweils gefolgt von einer 25 minütigen UVA-Bestrahlung, ebenso wie die Behandlung mit 2 x 0.3 %  $\beta$ -Propiolacton Viruspartikel liefert, die die Fähigkeit zur Verstärkung des effizienten DNA-Transports beibehalten. Mittels CPE (Zytopathischer Endpunktassay) wurde festgestellt, daß die drei Behandlungsmethoden hinsichtlich der Abnahme des Virustiters vergleichbar sind. Sowohl nach Behandlung mit 8-Methoxypsoralen/UV als auch mit  $\beta$ -Propiolacton war keine Transkription vom Virusgenom nachweisbar. Mittels des empfindlicheren Plaque-Assays wurde jedoch festgestellt, daß  $\beta$ -Propiolacton-behandelte Viren replizieren können, wenn ausreichende Mengen der komplementierenden Zelllinie vorhanden sind. Im Gegensatz dazu blockiert die Behandlung des Virus mit beiden Psoralenderivaten die Virusreplikation komplett, sodaß mittels dieses Tests keine Plaques nachweisbar waren.

Die RNA-Analyse zum Nachweis der Genexpression wurde entweder mit einer Adenovirus 5 Ela-Sonde durchgeführt, die einen Teil des Ela-Gens erkennt, der im Adenovirus dl312 deletiert ist, oder eine Adenovirus 5 E3-Sonde, die

einen Teil der E3-Region erkennt, die für das abundante E3 19K Glykoprotein kodiert (Ela dient als Kontrolle; ein RNA-Signal sollte beim Virus dl1312 fehlen, jedoch bei dl1014 nachweisbar sein, da dieses eine Wildtyp El-Region besitzt). Von der Expression von E3 wird angenommen, daß sie eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf transfizierte Zellen spielen könnte, da zumindest zwei der E3-Gene die Oberflächenexpression von MHC Klasse I-Molekülen und TNF-Rezeptor-Molekülen an der Oberfläche der infizierten Zellen modulieren. Für die Anwendung des Virus dl1014 in gentherapeutischen Anwendungen, bei denen immunogene Tumorzellen hergestellt werden, ist daher ein Defekt in der E3-Region erwünscht, da die Expression dieser Region in diesem Kontext mit der Immunantwort auf transfizierte Zellen interferieren könnte.

Das Polylysin-gekoppelte (oder ionisch gebundene) endosomolytische Mittel wird bevorzugt als Bestandteil eines ternären oder Kombinationskomplexes eingesetzt. Die Kopplung von Adenovirus an Polylysin kann auf verschiedene Arten erfolgen:

Die Kopplung von Virus auf chemischem Weg kann in für die Kopplung von Peptiden an sich bekannter Weise erfolgen, wobei, falls erforderlich, die Einzelkomponenten vor der Kopplungsreaktion mit Linkersubstanzen versehen werden (diese Maßnahme ist dann erforderlich, wenn von vornherein keine für die Kopplung geeignete funktionelle Gruppe, z.B. eine Mercapto- oder Alkoholgruppe, verfügbar ist). Bei den Linkersubstanzen handelt es sich um bifunktionelle Verbindungen, die zunächst mit funktionellen Gruppen der Einzelkomponenten zur Reaktion gebracht werden, worauf die Kopplung der modifizierten Einzelkomponenten durchgeführt wird.

Eine mögliche Art der Kopplung des Virus an Polylysin erfolgt in ähnlicher Weise wie bei der Herstellung von Transferrin-Polylysinkonjugaten (Wagner et al., 1990) nach Modifizierung des defekten Adenovirus mittels eines heterobifunktionellen Reagens. Falls ein Virus geeignete Kohlenhydratketten aufweist, kann es mit der DNA-bindenden Substanz über eine oder mehrere Kohlenhydratketten des Glykoproteins verbunden werden (Wagner et al., 1991b).

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung der Virus-Polylysin-Konjugate ist die enzymatische Kopplung des Virus an eine DNA-bindende Substanz, insbesondere ein Polyamin, durch eine Transglutaminase (Zatloukal et al., 1992).

Eine weitere Methode zur Herstellung der Adenovirus-Polylysin-Konjugate besteht darin, das Virus über eine Biotin-Protein-Brücke, vorzugsweise eine Biotin-Streptavidin Brücke, an das Polykation zu koppeln (Wagner et al., 1992).

Gegebenenfalls kann die Bindung an Biotin auch über Avidin erfolgen.

Ferner ist es möglich, die Bindung zwischen Virus und Polylysin herzustellen, indem einerseits das Virus biotinyliert wird und andererseits ein anti-Biotin-Antikörper mit Polylysin konjugiert und die Bindung zwischen Virus und Polylysin über die Biotin/Antikörper-Bindung hergestellt wird, wobei handelsübliche polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen Biotin eingesetzt werden können.

Die Bindung zwischen dem Virus und Polylysin kann auch hergestellt werden, indem Polylysin mit einem Lectin

gekoppelt wird, das Affinität zu einem Virus-Oberflächenglykoprotein hat, wobei die Bindung in einem solchen Konjugat über die Bindung zwischen dem Lectin und dem Glykoprotein erfolgt. Weist das Virus von sich aus keine geeigneten Kohlenhydratseitenketten auf, kann es entsprechend modifiziert werden.

Das Virus kann für den Fall, daß es auf seinen Oberflächenproteinen Regionen aufweist, die sauer sind und daher an ein Polykation binden können, auch ionisch an das DNA-bindende Molekül gebunden sein.

Neben ausgewählten Adenovirusmutanten kann die endosomolytische Komponente der in b) definierten Konjugate auch ein Peptid sein, das kovalent oder mittels ionischer Bindung an ein DNA-bindendes Molekül gebunden ist. Bezuglich der Anforderungen, die an derartige Peptide gestellt werden sowie deren Kopplung an das DNA-bindende Molekül wird auf die WO 93/07283 verwiesen.

Bevorzugt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein synthetisches dimeres Influenza-Peptid, ionisch an Polylysin gebunden, verwendet, mit dem hohe Expressionswerte für IL-2 in Melanomzellen erzielt werden. Melanomzellen, die in Gegenwart dieses Peptidkonjugats mittels Transferrin-Polylysin-Konjugaten mit IL-2-Plasmid-DNA transfiziert waren, erwiesen sich als Krebsvakzine mit prophylaktischer Schutzwirkung gegen Tumorbildung.

Bezuglich der Herstellung der Transfektionskomplexe ist die Reihenfolge der Schritte nicht kritisch, es kann zweckmäßig wie folgt vorgegangen werden:

Ausgehend von den DNA-Molekülen wird die DNA-bindende Substanz nach Art und Menge bestimmt, die die

Komplexierung der DNA gewährleistet, die erhaltenen Komplexe sind vorzugsweise im wesentlichen elektroneutral. Für die Komplexe, die das Virus-Konjugat und ein Internalisierungsfaktor-Konjugat enthalten, wird der Kationenanteil beider Konjugate hinsichtlich des Aspekts der Elektroneutralität in Betracht gezogen.

Bei der Bestimmung des molaren Verhältnisses der Komponenten a), b) und c) ist zu berücksichtigen, daß Komplexierung der DNA stattfindet und gewährleistet ist, daß der gebildete Komplex an die Zelle gebunden, in die Zelle befördert und daß er aus den Endosomen freigesetzt wird.

Das jeweils gewählte Verhältnis Internalisierungsfaktor-Konjugat/DNA richtet sich vor allem nach der Größe der Polykationmoleküle sowie nach der Anzahl und Verteilung der positiv geladenen Gruppierungen, Kriterien, die auf Größe und Struktur der zu transportierenden DNA abgestimmt werden, wobei auch das Viruskonjugat in Rechnung zu stellen ist. Vorzugsweise beträgt das molare Verhältnis Internalisierungsfaktor:Polylysin ca. 10:1 bis ca. 1:10.

Im Falle der Verwendung von Adenovirus-Konjugat und nicht-konjugierter DNA-bindender Substanz kann nach der Bestimmung des für die Effizienz der Transfektion und der Expression optimalen Verhältnisses Konjugat:DNA mit Hilfe von Titrationsen die Menge des Konjugat-Anteils bestimmt werden, der durch DNA-bindende Substanz ersetzbar ist.

Bevorzugt wird Polylysin sowohl als Komponente c), vorzugsweise konjugiert mit einem Internalisierungsfaktor, als auch als Bestandteil des Adenvoviruskonjugats b) eingesetzt.

Eine geeignete Methode zur Bestimmung des Verhältnisses der in den Komplexen enthaltenen Komponenten besteht darin, zuerst das in die Zelle zu importierende Genkonstrukt zu definieren und, wie oben beschrieben, ein Virus zu finden, das für die Transfektion geeignet ist. Dann wird das Virus an das Polykation gebunden und mit dem Genkonstrukt komplexiert. Ausgehend von einer konstanten DNA-Menge wird durch Titrationen das optimale Verhältnis zwischen Virus-Konjugat und Internalisierungsfaktor-Konjugat bzw. nicht-konjugierter DNA-bindender Substanz bestimmt.

Die Komplexe können hergestellt werden, indem die Komponenten a), b) und c), die jeweils in Form verdünnter Lösungen vorliegen, gemischt werden.

Das optimale Verhältnis von DNA zu Konjugat und nicht-konjugierter DNA-bindender Substanz wird durch Titrationen, d.h. in einer Reihe von Transfektionsexperimenten mit konstanter DNA-Menge und variabler Menge an Konjugat/Polylysin, bestimmt. Das optimale Verhältnis von Konjugat:Polykation in der Mischung kann mit Hilfe von Routineexperimenten bzw. aus dem Vergleich der optimalen Verhältnisse der in den Titrationsexperimenten eingesetzten Mischungen erhalten werden.

Die Herstellung der DNA-Komplexe kann bei physiologischen Salzkonzentrationen erfolgen. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz hoher Salzkonzentrationen (etwa 2 M NaCl) und anschließender Einstellung auf physiologische Bedingungen durch langsames Verdünnen bzw. Dialyse.

Die jeweils am besten geeignete Reihenfolge für die Mischung der Komponenten wird im einzelnen in Vorversuchen bestimmt.

Die Menge an eingesetztem endosomolytischen Konjugat richtet sich nach der im einzelnen vorgenommenen Transfektion. Es ist zweckmäßig, die Mindestmenge an endosomolytischem Konjugat einzusetzen, die erforderlich ist, um die Internalisierung des Komplexes in einen Großteil der Zellen und seine Freisetzung aus den Endosomen zu gewährleisten. Im Falle der Verwendung von Adenovirus-Konjugat wird die Menge an Konjugat auf den jeweiligen Zelltyp abgestimmt, dabei vor allem die Infektiosität des Virus für diesen Zelltyp zu berücksichtigen ist. Ein weiteres Kriterium ist das jeweilige Internalisierungsfaktor-Konjugat, insbesondere hinsichtlich des Internalisierungsfaktors, für den die Zielzelle eine definierte Anzahl von Rezeptoren aufweist. Außerdem richtet sich die Menge an endosomolytischem Konjugat nach der Menge der zu importierenden DNA. Für eine spezielle Anwendung wird in Vorversuchen mit den jeweils für die Transfektion vorgesehenen Zielzellen und dem für die Transfektion vorgesehenen Vektorsystem die optimale Konzentration an endosomolytischen Konjugat durch Titrieren ermittelt, wobei zweckmäßigerweise als DNA ein Genkonstrukt eingesetzt wird, das hinsichtlich der Größe mit dem für die konkrete Anwendung vorgesehenen weitgehend übereinstimmt und das zwecks einfacherer Messung der Effizienz des Gentransfers ein Reportergen enthält. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde die Eignung des Luciferasegens als Reportergen für derartige Versuche gezeigt.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt die mit den erfindungsgemäßen Komplexen transfizierten Tumorzellen bzw. Fibroblasten.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Krebsvakzine, erhältlich nach dem

erfindungsgemäßen Verfahren. Diese Vakzine sind pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend die transfizierten Tumorzellen oder die transfizierten Fibroblasten in Mischung mit Tumorzellen in einer pharmazeutisch annehmbaren Formulierung.

Die gebrauchsfertigen Krebsvakzine liegen vorzugsweise als Suspension vor, die gegebenenfalls durch Trypsinierung erhalten wird. Die Zellen befinden sich suspendiert in einem physiologischen Medium (physiologischer Kochsalz- oder Pufferlösung), das gegebenenfalls diejenigen Nährstoffe, insbesondere Aminosäuren, enthält, die die Zellen für die Aufrechterhaltung ihres Metabolismus für die kurze Zeit zwischen Fertigstellung des Vakzins und dessen Verabreichung benötigen.

In den Versuchen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurden, befanden sich die Melanomzellen in RPMI 1640 Medium mit einem Zusatz von fötalem Kälberserum (FCS).

Für die galenische Formulierung der erfindungsgemäßen Tumorvakzine wurden im Hinblick auf deren therapeutische Anwendung verschiedene Medien getestet.

Es zeigte sich, daß Zellkulturmedien mit Zusätzen wie Kälberserum, Humanserum, Humanserumalbumin und/oder Hydroxyethylcellulose die Lebensfähigkeit einer für das Vakzin ausreichenden Anzahl von Zellen gewährleisten. Im Hinblick auf eine möglichst gute Verträglichkeit befinden sich die Tumorvakzine zweckmäßig in Serum der Blutgruppe AB, als Medium kann auch autologes Serum verwendet werden. Gegebenenfalls enthält das Medium Zusätze von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen wie IFN-gamma oder GM-

CSF, um die Antigenpräsentation der Zellen günstig zu beeinflussen.

Der Typ von Krebsvakzinen, der mit Hilfe der vorliegenden Erfindung bereitgestellt werden kann, stellt eine neue Entwicklung auf dem Gebiet der Zytokintherapie dar. Sie hat den Vorteil, daß die schweren Nebenwirkungen systemisch verabreichter Zytokine aufgrund der lokal beschränkten Produktion und Wirkung des Zytokins vermieden werden können. Außer für die Behandlung von Melanomen und Colonkarzinomen können auch andere Krebsarten mit Hilfe der erfindungsgemäßen Krebsvakzine behandelt werden, z.B. Nierenkrebs oder Brustkrebs.

#### Figurenübersicht

- Fig. 1: Gentransport in primäre humane Melanomzellkulturen
- Fig. 2: Bestimmung der Liganden, die bei der Aufnahme von Gentransferkomplexen beteiligt sind. Verwendung von nicht-konjugiertem Polylysin
- Fig. 3: Effekt der Inaktivierung von Adenoviren durch Psoralen/UV auf die Genexpression in primären humanen Melanomzellen
- Fig. 4: Bestimmung der Langzeitzytotoxizität von Adenoviren
- Fig. 5: Wirkung der Bestrahlung von Tumorzellen auf die Expression transfizierter Gene
- Fig. 6: Einfluß der Plasmidkonzentration auf die Expression des Luciferase-Reportergens
- Fig. 7: Einfluß der Plasmidkonzentration auf die Expression von IL-2 und/oder IFN- $\gamma$
- Fig. 8: Verlust der Tumorigenizität transfizierter Maus-Melanomzellen

- Fig. 9: Induktion einer systemischen Immunantwort gegen Melanom in Mäusen durch Immunisierung mit zytokintransfizierten, bestrahlten Tumorzellen
- Fig. 10: EGF als Ligand für den Gentransfer in Zellen einer humanen epidermoiden Karzinomzelllinie (A: plus 2 % FCS, B: ohne FCS)
- Fig. 11: IL-2 Expression in Maus-Melanomzellen unter Verwendung verschiedener Vektoren
- Fig. 12: IL-2 Expression in Fibroblasten unter Verwendung verschiedener Vektoren
- Fig. 13: Stimulierung einer Immunantwort durch Melanomzellen, die auf ihrer Oberfläche HSA exprimieren
- Fig. 14: Stimulierung einer Immunantwort durch Melanomzellen, die auf ihrer Oberfläche das Rabies-Glykoprotein exprimieren
- Fig. 15: Titration von 8-Methoxypsoralen
- Fig. 16: Titration von 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen
- Fig. 17: Titration von  $\beta$ -Propiolacton
- Fig. 18: Gentransportaktivität von Adenovirus dl1014 nach Behandlung mit 8-Methoxypsoralen oder nach Behandlung mit niedrigen Konzentrationen von  $\beta$ -Propiolacton
- Fig. 19: Plaque-Assays von Adenovirus dl1014, inaktiviert mit 8-Methoxypsoralen,  $\beta$ -Propiolacton oder 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen
- Fig. 20: Plaque-Assays von Adenovirus dl1014, inaktiviert mit 8-Methoxypsoralen oder verschiedenen  $\beta$ -Propiolacton-Behandlungen
- Fig. 21: Genexpression vom inaktivierten Virus
- Fig. 22: Reverse Transkriptions-PCR-Analyse
- Fig. 23: Lokalisierung der Einlagerung von 8-Methoxypsoralen im Virusgenom

- Fig. 24: Wachstum humaner Melanomzellen in Abhängigkeit von der gamma-Strahlendosis
- Fig. 25: Schutzwirkung gegen Metastasenbildung durch Immunisierung mit zytokintransfizierten Melanomzellen (Transfektion mittels Adenovirus)
- Fig. 26: Wirksamkeit der Krebsvakzine in Abhängigkeit von der Zytokindosis
- Fig. 27: Schutzwirkung gegen Metastasenbildung durch Immunisierung mit zytokintransfizierten Melanomzellen (Transfektion mittels endosomolytischem Peptid)
- Fig. 28: Interleukin-2-Expression in humanen Melanomzellen
- Fig. 29: Einfluß des Endotoxingehaltes der DNA auf die Expression von IL-2 in humanen Melanomzellen

In den folgenden Beispielen, die die vorliegende Erfindung illustrieren, wurden, sofern nicht anders angegeben, die folgenden Materialien und Methoden verwendet:

a) Plasmid-Konstrukte

i) DNA-Plasmid-Konstrukte, enthaltend die für humanes oder Maus-IL-2 kodierende Sequenz

Für die in den Beispielen 6 bis 8 durchgeföhrten Versuche wurde das von Karasuyama et al., 1989, beschriebene Plasmid BCMGneo-mIL-2 verwendet.

Alternativ wurde ein Plasmid der Bezeichnung pWS2m hergestellt, das das Maus-IL-2-Gen unter Kontrolle des Zytomegalovirus Enhancer/Promotors enthält: Das Plasmid pH $\beta$ APr-1 (Gunning et al., 1987) wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten. Mittels Agarosegel-Reinigung wurde ein

2.5 kb Fragment isoliert, das das Ampicillin-Resistenzgen und den Replikationsursprung von pBR322 sowie das SV40-Polyadenylyierungssignal enthält. Dieses Fragment wurde mit dem CMV-Promotor/Enhancer ligiert, das als ein 0.7 kb PCR-Fragment vom Vektor pAD-CMV1 (beschrieben in der EP-A 393 438) amplifiziert und EcoRI/BamHI verdaut worden war. Das erhaltene Plasmid wurde pWS genannt. Die für Maus-IL-2 kodierende cDNA wurde als PCR-Fragment vom Plasmid BMGneo-mIL-2 (Karasuyama und Melchers, 1988) erhalten. In Richtung des 5' Endes vom ersten ATG Codon wurde die Sequenz GCCGCC zwecks optimaler Translationsinitiation angehängt. Die 3'-nicht-kodierende Region wurde entfernt. Das PCR-Fragment wurde in den mittels SalI/BamHI-Verdau geöffneten Vektor pWS ligiert.

Für die Anwendung in Humanzellen wird der Vektor pWS2 eingesetzt, der in ähnlicher Weise wie der Vektor pWS2m erhalten wird, mit dem Unterschied, daß als Vorlage für die PCR-Amplifikation statt dem Plasmid BMGneo-mIL-2 das Plasmid pIL2-50A (Taniguchi et al., 1983), der die für humanes IL-2 kodierende cDNA enthält, dient.

Als Alternative zu einem Plasmid mit dem Ampicillin-Resistenzgen wurde der Vektor pGShIL-2tet hergestellt, das das Tetracyclin-Resistenzgen, herausgeschnitten aus pBR327, enthält.

Für das Plasmid pCM2 wurde die Maus-IL-2 Sequenz zusammen mit den 5'- und 3' flankierenden Regionen (Spalt- und Poly(A)-Signale vom Kaninchen- $\beta$ -Globingen) als SalI/BamHI-Fragment aus BCMGneo-mIL-2 herausgeschnitten und in den Vektor pAD-CMV1 eingesetzt.

ii) DNA-Plasmid-Konstrukt, enthaltend die für Maus-IFN- $\gamma$  kodierende Sequenz

Es wurde das von Gray und Goeddel, 1983, beschriebene Plasmid pSVEmuIFN- $\gamma$  verwendet.

iii) DNA-Plasmid-Konstrukt pHSA, enthaltend die für HSA kodierende Sequenz

Das Plasmid pHSA, das die vom CMV-Promotor getriebene HSA-Sequenz enthält, wurde erhalten, indem die HSA-cDNA (Kay et al., 1990) in die BstXI-Stelle des Plasmids pCDM8 (Seed, 1987) kloniert wurde.

iv) DNA-Plasmid-Konstrukt pWS-RABIES, enthaltend die für das Rabies-Glykoprotein kodierende Sequenz

Die für das Rabies-Glykoprotein kodierende Sequenz wurde aus dem Vektor pKSV-10 (Pharmacia), der die Rabies-Glykoprotein cDNA (Anilionis et al., 1982) in die Bgl II-Stelle abwärts vom SV40-Promotor hineinkloniert enthält, als Bgl II-Fragment isoliert. Der Vektor pWS2m wurde mit Bgl II und BamHI geschnitten. Das die murine IL-2 cDNA tragende Fragment wurde über Agarosegel-Elektrophorese abgetrennt und das dem Vektor pWS entsprechende Fragment isoliert und mit dem Rabies-Fragment ligiert. Die richtige Rabies-Orientierung wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Rabies-Glykoprotein-Sequenz ist als SEQ ID NO:1 dargestellt.

v) DNA-Plasmid-Konstrukt pWS-Gm, enthaltend die für murinen GM-CSF kodierende Sequenz

Der in i) beschriebene Vektor pWS2 wurde mit SalI und BamHI geschnitten und das dadurch freigesetzte, für IL-2 kodierende Fragment durch Agarosegelelektrophorese abgetrennt. Die für murinen GM-CSF kodierende DNA wurde vollsynthetisch aus 12 sich gegenseitig überlappenden

Oligonukleotiden hergestellt. Die verwendete Sequenz entsprach der von Miyatake et al., 1985, beschriebenen Sequenz (kodierender Bereich von Position 32 bis Position 457), mit dem Unterschied von stillen Austauschen in Position 178 (A statt G), Position 274 (C statt G) und Position 355 (C statt G). Außerdem wurde das Triplet AGC (Position 446 bis 448) durch GTC ersetzt. Der 5'-Bereich wurde mit einem SalI-kompatiblen, der 3'-Bereich mit einem BamHI-kompatiblen Überhang versehen. Das 5'-Ende wurde analog zur IL-2-Sequenz in pWS2 mit einer GCCGCC-Sequenz versehen. Das synthetische GM-CSF-Gen wurde nach dem "Shot-gun"-Verfahren (Sambrook, 1989) in den Vektor pWS2 einkloniert und sequenziert. Die mittels Sequenzanalyse aufgezeigten Fehler in der Sequenz wurden durch gezielte Mutagenese nach der Phosphorothioat-Methode (Amersham-Kit) korrigiert.

vi) DNA-Plasmid-Konstrukt pGShIL-2tet, enthaltend die für humanes IL-2 kodierende Sequenz

Eine IL-2-Kassette, enthaltend den CMV-Enhancer/Promotor, die für IL-2 kodierende Sequenz und die SV40-PolyA-Sequenz, wurde mittels PCR unter Vorlage des in i) beschriebenen Vektors pWS2 erhalten. Das PCR-Produkt wurde einem Restriktionsenzymverdau mit EcoRI unterworfen und in die EcoRI/SmaI-Stelle des Plasmids pUC19 (Pharmacia) hineinkloniert. Das erhaltene Plasmid wurde pGShIL-2 genannt. Als Quelle für das Tetracycline-Resistenz-Gen und Teile der "upstream" Region des β-Lactanase-Gens (Ampicillin-Resistenz-Gen) diente das Plasmid pBR327 (Soberon et al., 1980), das mit SspI und AvaI verdaut worden war. Zusammen mit einem EcoRI/AvaI-Adaptor wurde die isolierte tet-Sequenz in die EcoRI/SspI-Stelle von pGShIL-2 kloniert. Die IL-2-Kassette des resultierenden Klons pGShIL-2tet/amp wurde sequenziert: daraufhin wurde die amp-Sequenz mit Eam1105I

und SspI herausgeschnitten und das Plasmid religiert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pGShIL-2tet bezeichnet.

vii) Reporterplasmid-Konstrukt pCMVL

Das Plasmid pCMV wurde hergestellt, indem das BamHI-Insert des Plasmids pSTCX556 (Severne et al., 1988) entfernt, das Plasmid mit Klenow-Fragment behandelt und das HindIII/SspI sowie Klenow-behandelte Fragment aus dem Plasmid pRSVL (enthaltend das Photinus pyralis Luciferasegen unter der Kontrolle des Rous Sarcoma Virus LTR Enhancer/Promoters (Uchida et al., 1977, De Wet et al., 1987) eingesetzt wurde. Das Reporter-Plasmid wurde pCMVL bezeichnet.

b) Herstellung von Transferrin-Polylysin-Konjugaten

Zur Synthese von Konjugaten aus Transferrin und Polylysin mit einer Kettenlänge von 290 Lysinresten wurde die Wagner et al., 1991b, beschriebene Methode eingesetzt.

c) Herstellung von EGF-Polylysin-Konjugaten

1 mg EGF (Epidermal Growth Factor, Sigma, St. Louis, Cat. No. E-4127) wurde durch Gelfiltration (Sephadex G-10) mit HBS als Elutionspuffer gereinigt.

135 nmol (0.8 mg) Epidermal Growth Factor (EGF) in 1.5 ml HBS wurden mit einer 15 mM ethanolischer Lösung von SPDP (1.2 µmol) behandelt. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurde das modifizierte Protein über eine Sephadex G-10 Säule gelfiltriert, wobei 70 nmol EGF, modifiziert mit 50 nmol Dithiopyridinlinker, erhalten wurde. Das modifizierte Protein wurde mit 3-Mercaptopropionat-modifiziertem Polylysin (50 nmol, durchschnittliche Kettenlänge 290 Lysinmonomere, modifiziert mit 150 nmol Mercaptopropionat-Linker) in

insgesamt 1 ml HBS unter Argonatmosphäre reagieren gelassen. Konjugate wurden mittels Gelpermeationschromatographie auf einer Superdex 75 Säule (Pharmacia) isoliert (Puffer: 0.5 M Natriumchlorid). Die Produktfraktion enthielt ein Konjugat, bestehend aus 20 nmol Streptavidin und 25 nmol Polylysin.

d) Herstellung von Streptavidin-Polylysin-Konjugaten

Die Kopplung von Streptavidin mit Polylysin wurde nach der von Wagner et al., 1990, und in der EP-A1 388 758 für die Herstellung von Transferrin-Polylysin-Konjugaten beschriebenen Methode durchgeführt.

79 nmol (4.7 mg) Streptavidin in 1 ml 200 mM HEPES pH 7.9 und 300 mM NaCl wurden mit einer 15 mM ethanolischen Lösung von SPDP (236 nmol) behandelt. Nach 1.5 h bei Raumtemperatur wurde das modifizierte Protein über eine Sephadex G-25 Säule gelfiltriert, wobei 75 nmol Streptavidin, modifiziert mit 196 nmol Dithiopyridinlinker, erhalten wurde. Das modifizierte Protein wurde mit 3-Mercaptopropionat-modifiziertem Polylysin (75 nmol, durchschnittliche Kettenlänge 290 Lysinmonomere, modifiziert mit 190 nmol Mercaptopropionat-Linker) in 2.6 ml 100 mM HEPES pH 7.9, 150 mM NaCl unter Argonatmosphäre reagieren gelassen. Konjugate wurden mittels Kationenaustauschchromatographie auf einer Mono S HR5-Säule (Pharmacia) isoliert. (Gradient: 20 - 100 % Puffer. Puffer A: 50 mM HEPES pH 7.9; Puffer B: Puffer A plus 3 M Natriumchlorid. Die Produktfraktion eluierte bei einer Salzkonzentration zwischen 1.2 M und 1.7 M. Dialyse gegen HBS (20 mM HEPES pH 7.3, 150 mM NaCl) ergab ein Konjugat, bestehend aus 45 nmol Streptavidin und 53 nmol Polylysin.

e) Herstellung von biotinyliertem, inaktiviertem Adenovirus

i) Adenovirus dl312-Präparationen

Es wurde der von Jones und Shenk, 1979, beschriebene Adenovirus-Stamm dl312, der eine Deletion in der Ela-Region aufweist, verwendet. Die Vermehrung des Virus wurde in der Ela-trans-komplementierenden Zelllinie 293 durchgeführt, wobei die Herstellung in großem Maßstab durchgeführt wurde, wie von Davidson und Hassell, 1987, beschrieben. Das gereinigte Virus wurde in Lagerpuffer (100 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 % BSA, 50 % Glyzerin) oder in HBS/40 % Glyzerin aufgenommen und Aliquots bei -70° C aufbewahrt. Die Bestimmung der Virion-Konzentration wurde mittels UV-spektrophotometrischer Analyse der extrahierten genomischen Virus-DNA durchgeführt (Formel: eine optische Dichteeinheit (OD, A<sub>260</sub>) entspricht 10<sup>12</sup> Viruspartikeln/ml; (Chardonnet und Dales, 1970)).

ii) Adenovirus dl1014-Präparation

Das Adenovirus dl1014, beschrieben von Bridge und Ketner, 1989, wurde in der Zelllinie W162, die von der Zelllinie Vero (ATCC No. CCL81) abgeleitet ist und deren Herstellung von Weinberg und Ketner, 1983, beschrieben wurde, propagiert. Die Herstellung in größerem Maßstab, Reinigung und Virionkonzentrationsbestimmung wurden durchgeführt, wie für dl312 beschrieben.

iii) Biotinylierung von Adenovirus

2.4 ml einer gelfiltrierten (Sephadex G-25 PD10, Pharmacia) Lösung von Adenovirus dl312 (ca. 10<sup>11</sup> Partikel) in 150 mM NaCl / 5 mM HEPES, pH 7.9 / 10 %

Glycerin, wurde mit 10 µl (10 nmol) einer 1 mM Lösung von NHS-LC-Biotin (Pierce 21335) versetzt. Nach 3 h bei Raumtemperatur wurde der Biotin-modifizierte Virus durch Gelfiltration (wie oben) vom überschüssigen Reagens abgetrennt. Die Lösung wurde durch Zugabe von Glycerin auf eine Glycerinkonzentration von 40 % gebracht (Gesamtvolumen 3.2 ml) und bei -25°C gelagert. Die Biotinylierung des Virus konnte in einem qualitativen Nachweis nach Tropfen von verschiedenen Verdünnungen auf Cellulose-Nitrat Membran nachgewiesen werden: nach Trocknen bei 80°C / 2 h im Vakuumtrockenschrank, Blocken mit BSA, Inkubieren mit Streptavidin-konjugierter Alkalischer Phosphatase (BRL), Waschen und 1 h Inkubation mit der Entwicklungslösung NBT/X-Phosphat (Nitroblau-Tetrazolium Salz/5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, Toluidin-Salz; Boehringer Mannheim) wurde eine positive Farbreaktion gefunden.

Bei der Biotinylierung von Adenovirus d11014 wurde von 15 ml Adenoviruspräparation ( $1.2 \times 10^{12}$  Partikel pro ml) ausgegangen, die mit 150 µl, 1 mM NHS-LC-Biotin behandelt wurden. Nach 3 h bei Raumtemperatur wurde gegen 1 l HBS plus 40 % Glycerin bei 4°C über Nacht dialysiert, dann wurde der Puffer durch frischen ersetzt und eine zweite Dialyse durchgeführt. Es wurde eine Viruspräparation mit einem Titer von ca.  $1.2 \times 10^{12}$  Partikeln pro ml erhalten.

iv) Inaktivierung von biotinyliertem Adenovirus mit 8-Methoxypsonalen

Je 200 µl biotinylierte Viruspräparation wurden in zwei Vertiefungen einer 1.6 cm Gewebskulturplatte gegeben. Zu jeder Probe wurden 2 µl (33 mg/ml) 8-Methoxypsonalen (Sigma, Katalog Nr. M-3501, gelöst in DMSO) gegeben, die Schale auf Eis gestellt und 10 min lang mit einer UV-Lampe (365 nm; UVP TL-33 Lampe) bestrahlt, wobei der

Abstand der Probe vom Filter 4 cm betrug. Nach der Bestrahlung wurden die zwei Proben vereinigt und gelfiltriert (G50, Nick-Säule, Pharmacia), wobei die Säule mit 40 % Glycerin in HBS vorequilibriert worden war.

Die Inaktivierung von biotinyliertem Adenovirus dl1014 wurde durchgeführt, indem 4 ml Viruspräparation ( $1 \times 10^{12}$  Viruspartikel) mit 40  $\mu$ l 8-Methoxypsoralen (33  $\mu$ g/ $\mu$ l, in DMSO) versetzt wurden. Die Proben wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen und in 12 x 300  $\mu$ l Kulturschalen gegeben, auf Eis gestellt und 25 min lang, wie oben beschrieben, UV-bestrahlt. Anschließend wurde eine Gelfiltration (in zwei Portionen) über eine G-25 PD10 Säule, mit HBS/40 % Glycerin, durchgeführt. Es wurden 4.5 ml Viruspräparation mit einem Titer von  $9.4 \times 10^{11}$  Partikel pro ml erhalten.

#### f) Herstellung von Transfektionskomplexen

Die ternären Komplexe wurden in drei Schritten hergestellt. Im ersten Schritt wurde biotinyliertes Adenovirus in 100  $\mu$ l HBS mit streptavidinyliertem Polylysin (StreptpL) in 100  $\mu$ l HBS gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 6  $\mu$ g Plasmid-DNA in 150  $\mu$ l HBS beigegeben, gut gemischt und weitere 30 min inkubiert. Abschließend wurde Polylysin-modifiziertes humanes Transferrin (TfpL) in 150  $\mu$ l HBS beigegeben, gründlich gemischt und 30 min inkubiert. (Die Mengen für Adenovirus, StreptpL und TfpL werden jeweils bei den einzelnen Beispielen angegeben.) Das Verhältnis zwischen Plasmid DNA und Polylysin-Konjugaten wurde im Hinblick auf Elektroneutralität in den endgültigen Komplexen berechnet. Für die Transfektionen wurden die Komplexe auf die Zellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml Kulturmedium ohne FCS aufgebracht. Nach 4 h Inkubation

bei 37°C wurde das Medium entfernt und frisches, Serum enthaltendes Kulturmedium beigegeben.

g) Zellen und Kulturmedien

i) Maus-Melanomzellen

Die Maus-Melanomzelllinie Cloudman S91 (Klon M3) wurde von ATCC (No. CCL 53.1) erworben. Die Zellen wurden in 6 cm Plastikschalen oder T25 Kulturflaschen, beschichtet mit 0.1 % Gelatine, in Ham's F10 Medium, enthaltend 12.5 % Pferdeserum, 2.5 % FCS, 2 mM Glutamin und Antibiotika, gezüchtet.

ii) Mausfibroblasten

Primäre Mausfibroblasten wurden wie folgt aus DBA/2 Mäusen isoliert: 4 Wochen alte DBA/2 Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und in 70 % Ethanol getaucht. Die Muskeln wurden unter sterilen Bedingungen von den hinteren Gliedmaßen entfernt und mit PBS gewaschen. Die Proben wurden in Stücke kleiner als 2 mm zerteilt und überschüssiges PBS entfernt. Dann wurden die Gewebsfragmente 3 x mit 5 ml PBS, enthaltend 0.25 % Trypsin (aus Schweinepankreas, Sigma, Katalog Nr. T-2904), 0.1 % Collagenase (Typ XI, Sigma, Katalog Nr. C-9407), 0.1 % BSA (Fraktion V, Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 735 094), gewaschen und 30 min unter Schwenken bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Gewebsfragmente 5 min lang absetzen gelassen, und der Überstand, der die freigesetzten Zellen enthielt, wurde mit 5 ml DMEM, enthaltend 20 % FCS, vermischt. Das nicht-dissozierte Material wurde weitere 30 min lang verdaut und der Überstand, wie oben beschrieben, gesammelt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis das gesamte Material dissoziert war. Die vereinigten Überstände wurden 15 min

bei 500 x g zentrifugiert, das Zellpellet in DMEM, enthaltend 20 % FCS, resuspendiert und die Zellen in Kulturflaschen ausgesät. Nach 30 min wurden die nicht adhäsierten Zellen abgesaugt und frisches Medium zugegeben.

iii) Humane Melanomzellen

Primäre humane Melanomzellen wurden aus chirurgisch entfernten Melanomen isoliert. Die Tumore wurden mechanisch (mit Pinzette und chirurgischem Messer) in Gegenwart von RPMI 1640 Kulturmedium, enthaltend 5 % FCS, 2 mM Glutamin und Antibiotika, in kleine Fragmente zerteilt. Dann wurden die Gewebsfragmente vorsichtig mit dem Kolben einer Spritze durch ein Metallsieb gedrückt. Daraufhin wurde das Material mehrere Male durch Zentrifugation und Resuspension gewaschen, und die freigesetzten Zellen wurden in T25 Kulturflaschen ausgesät.

iv) Humanfibroblasten

Nach der chirurgischen Entfernung wurden Hautbiopsien in 4°C DMEM, enthaltend 10 % FCS, 2 mM Glutamin und Antibiotika (Penicillin/Streptamycin oder, im Fall von Humanfibroblasten, Gentamycin), gegeben. Die Biopsien wurden in einer Gewebekultureinrichtung ausgiebig mit Pinzette und chirurgischem Messer im laminaren Luftstrom in sterilen 6 cm Plastikschalen zerkleinert. Dann wurden 3 ml DMEM, enthaltend 20 % FCS, 2 mM Glutamin und Antibiotika beigegeben, und die Kultur in einen 37°C Brutschrank gegeben. Nach 10 Tagen wurde das Medium durch DMEM, enthaltend 10 % FCS, ausgetauscht. Dann wurde das Medium weiter 2 x wöchentlich gewechselt. 4 Wochen nach Beginn der Kultur wurden die Zellen, die aus den

Gewebsfragmenten herausgewachsen waren, trypsinisiert und für die Transfektion in neue Kulturschalen ausplattiert.

Eine alternative, bevorzugte Methode bestand darin, die Hautstücke nach der Zerkleinerung in frisches Medium zu überführen und nach Bedarf 1 bis 2 x mit Medium zu waschen. 5 bis 10 Gewebestücke wurden in eine T25-Gewebekulturflasche, deren Oberfläche mit DMEM plus 10 % FCS benetzt worden war, gegeben und gleichmäßig verteilt, worauf die Flasche umgedreht wurde. Dies bewirkte, daß die Biopsien herunterhängen ("hanging drop configuration"; diese Methode wurde von Jones, 1989, beschrieben). Nach 1 bis 3 h im Brutschrank wurden die Flaschen wieder umgedreht und mit 1 bis 2 ml Medium befüllt. Festsitzende Biopsien wurden nach 24 h auf 5 ml aufgefüllt; andernfalls wurde der Vorgang wiederholt. Nach 6 bis 10 Tagen wuchsen die ersten Fibroblasten aus, von diesem Zeitpunkt an wurde einmal wöchentlich das Medium gewechselt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie in eine T75-Flasche passagiert.

v) KB-Zellen

Die humane epidermoide Karzinomzelllinie KB wurde von ATCC (No. CCL 17) erworben. Die Zellen wurden in 6 cm Plastikschalen in MEM, 10 % FCS, 2 mM Glutamin und Antibiotika, gezüchtet.

h) Bestimmung der Genexpression

i) Luciferase-Assay

Die Herstellung von Zellextrakten, die Standardisierung des Proteingehalts sowie die Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden durchgeführt, wie von

Zenke et al., 1990, Cotten et al., 1990, bzw. in der EP 388 758 beschrieben.

ii) IL-2 Assay

Die Expression von Interleukin-2 wurde mit Hilfe eines Bioassays bestimmt, wie von Karasuyama und Melchers, 1988, beschrieben. Zusätzlich wurde die IL-2 Produktion unter Verwendung des IL-2 ELISA-Kits von Becton Dickinson (Katalog Nr. 30032) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

iii) IFN- $\gamma$ -Assay

Die Expression von Maus-IFN- $\gamma$  wurde unter Verwendung des IFN- $\gamma$  ELISA "Intertest- $\gamma$ " (Genzyme, Katalog Nr. 1557-00) durchgeführt.

iv) GM-CSF-Assay

Die Expressionswerte für GM-CSF wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISAs (Endogen) bestimmt.

j) Testung von Komplex-Komponenten

Um die Aussagekraft von Experimenten hinsichtlich Internalisierungsfähigkeit von Liganden oder Effizienz von DNA-Konstrukten zu testen, wurden in Vorversuchen Transfektionsversuche mit verschiedenen Viruspräparationen durchgeführt. Diese Versuche haben gezeigt, daß die diesbezüglich mit dl312 erhaltenen Ergebnisse auf Psoralen/UV-inaktiviertes Adenovirus dl312 und auf (Psoralen/UV-inaktiviertes) Adenovirus dl1014 übertragen werden können. In einigen Versuchen wurde daher stellvertretend dl312 verwendet.

### Beispiel 1

#### Gentransport in primäre humane Melanomzellkulturen

Primäre humane Melanomzell-Isolate, die von zwei verschiedenen Patienten erhalten worden waren (HMM-1 und HMM-2), wurden nach verschiedenen Zeitintervallen ab Kulturbeginn mit Komplexen transfiziert, die folgende Komponenten enthielten:  $1.7 \times 10^{10}$  Adenoviruspartikel dl312, 100 ng StreptpL, 6 µg pCMVL-DNA, 7 µg Tfpl. 24 h nach der Transfektion wurde die Luciferaseexpression bestimmt. Die Expression wurde auf der Grundlage des Proteingehalts der Zellsäfte auf  $1 \times 10^6$  Zellen standardisiert. Das Ergebnis dieser Transfektionsversuche ist in Fig. 1 dargestellt.

### Beispiel 2

#### Bestimmung der Liganden, die bei der Aufnahme von Gentransferkomplexen beteiligt sind

Primäre humane Melanomzell-Isolate der Bezeichnung HMM-1 wurden mit  $1.7 \times 10^{10}$  Adenoviruspartikeln dl312, 100 ng StreptpL, 6 µg pCMVL-DNA, 7 µg Tfpl, 2 Wochen nach Beginn der Kultur transfiziert. Parallel dazu wurde die Transfektion in Gegenwart eines 50 molaren Überschusses von freiem, eisenbeladenem Transferrin als Konkurrent um die Internalisierung der Tfpl-DNA-Adenovirus-Komplexe durchgeführt. Als Alternative wurden Transfektionskomplexe hergestellt, in denen das Tfpl durch nicht konjugiertes pL ersetzt wurde (pL). Das Ergebnis dieser Versuche ist in Fig. 2 dargestellt. Es zeigte sich, daß der Zusatz von freiem Transferrin die Menge der Luciferaseexpression verringert, was darauf

hindeutet, daß die Komplexe einerseits, zumindest teilweise, durch Bindung an den Transferrinrezeptor aufgenommen werden. Andererseits deutet jedoch die noch immer beträchtliche Genexpression, die in Gegenwart von freiem Transferrin gesehen wird, darauf hin, daß auch die Bindung an die Adenovirusrezeptoren einen größeren Beitrag leistet.

### Beispiel 3

Einfluß der Inaktivierung von Adenovirus d1312 mit Psoralen/UV auf die Langzeit-Toxizität in transfizierten primären Humanmelanomzellen

3 x 10<sup>5</sup> HMM-1 primäre humane Melanomzellen pro 6 cm Petrischale wurden mit Komplexen transfiziert, die bestanden aus 1.2 x 10<sup>10</sup> Adenoviruspartikeln d1312, 1.200 ng StreptpL, 6 µg pCMVL und 6.6 µg Tfpl oder 7.5 x 10<sup>9</sup> 8-Methoxypsoralen/UV-inaktivierten Adenoviruspartikeln d1312 (d1312 PI), 600 ng StreptpL, 6 µg pCMVL und 6.6 µg Tfpl (die optimale Menge von StreptpL für die verschiedenen Viren war in Vorversuchen mittels Titration ermittelt worden). Nach Tag 1, Tag 3 und Tag 7 nach der Transfektion wurde die Luciferaseexpression pro 3 x 10<sup>5</sup> Zellen gemessen. Der Effekt der 8-Methoxypsoralen/UV-Inaktivierung auf die Genexpression ist in Fig. 3 dargestellt. 7 Tage nach der Transfektion war eine starke Verringerung der Genexpression zu beobachten, die auch mit schweren zytopathischen Veränderungen in dieser Kultur korrelierte. Die Transfektion der Zellen mit 8-Methoxypsoralen/UV-inaktiviertem Adenovirus verringerte die zytopathischen Veränderungen signifikant und führte am 7. Tag zu 10fach höheren Expressionswerten als das nicht-inaktivierte Virus.

#### Beispiel 4

##### Bestimmung der Langzeitzytotoxizität von Adenoviren

Fibroblasten, die aus einem malignen Melanom stammen, wurden mit Kombinationskomplexen, die entweder Adenovirus dl312, 8-Methoxypsoralen/UV-inaktiviertes Adenovirus dl312 oder Adenovirus dl1014 enthielten, transfiziert.

Die Zellen wurden mit Komplexen transfiziert, die folgende Komponenten enthielten: 6 µg pCMVL-DNA, 0.8 µg StrepttpL, 6.8 µg TfpL und 20 µl Adenovirus dl312-Präparation ( $0.25 \times 10^{12}$  Viruspartikel pro ml) oder 40 µl 8-Methoxypsoralen/UV-inaktivierter Adenovirus dl312-Präparation ( $0.13 \times 10^{12}$  Viruspartikel pro ml) oder 3 µl Adenovirus dl1014-Präparation ( $4.1 \times 10^{12}$  Viruspartikel pro ml). 100 µl Aliquots dieser Mischung bzw., um die in Fig. 4 angegebenen Virus:Zell-Verhältnisse zu erhalten, eine 1:3 Serienverdünnung dieser Mischung wurden auf  $3 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturplatte (24 Vertiefungen pro Platte) in 500 µl RPMI + 2 % FCS aufgebracht. Nach 2 h bei 37°C wurde das Medium durch 2 ml RPMI + 10 % FCS ersetzt. Nach 8 Tagen wurde das Medium entfernt und die Zellen 5 min lang mit 4 % Formaldehyd und 150 mM NaCl fixiert und dann 10 min lang mit 0.1 % Kristallviolett in 2 % Ethanol gefärbt. Daraufhin wurden die Zellen 2 x mit PBS, 1 x mit Wasser gewaschen und photographiert. Das Ergebnis des Zytotoxizitätstests ist in Fig. 4 gezeigt: Bei einem Standardverhältnis von Virus:Zellen von 10.000:1 ist Adenovirus dl312 zytotoxisch; diese Zytotoxizität wird durch Psoralen/UV-Behandlung des Virus abgeschwächt. Dieselbe Menge Adenovirus dl1014 zeigte keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen.

### Beispiel 5

#### Wirkung der Bestrahlung der Tumorzellen auf die Genexpression

$3 \times 10^5$  primäre humane Melanomzellen der Bezeichnung HMM-5 bzw. der Maus-Melanomzelllinie M-3 wurden mit Komplexen behandelt, die  $3 \times 10^9$  8-Methoxypsoralen/UV-inaktivierte Adenoviruspartikel dl1014, 600 ng StreptpL, 6 µg pCMVL und 6.8 µg Tfpl enthielten. 6 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Dosen im Bereich von 0 - 100 Gy bestrahlt. 48 h nach der Bestrahlung wurde die Expression des transfizierten Luciferasegens gemessen. Die in Fig. 5 angegebenen Werte stellen die Luciferaseexpression in Lichteinheiten pro µg Protein im Zellysat dar.

### Beispiel 6

#### Einfluß der Plasmidkonzentration auf die Genexpression

$3 \times 10^5$  M-3 Maus-Melanomzellen wurden mit Komplexen, bestehend aus  $8.6 \times 10^9$  8-Methoxypsoralen/UV-inaktivierten Adenoviruspartikeln dl1014, 400 ng StreptpL, 6 µg DNA und 5.1 µg Tfpl transfiziert. Die Komplexe wurden mit Plasmidkombinationen (pCMVL/pSP = pSP65 Boehringer Mannheim; pSVEmu-IFN-γ; IFN-γ/pBCMGneo-mIL-2) bei verschiedenen Mengenverhältnissen der Plasmide transfiziert. Die Mengenverhältnisse der Plasmide sowie die erhaltenen Genexpressionswerte sind Tabelle I sowie Fig. 6 (Luciferaseexpression) und Fig. 7 (IFN-γ/IL-2) entnehmbar.

### Beispiel 7

#### Verlust der Tumorigenität transfizierter Maus-Melanomzellen

M-3 Maus-Melanomzellen ( $3 \times 10^5$  Zellen pro 6 cm Petrischale) wurden mit  $2 \times 10^9$  Adenoviruspartikeln dl312, 250 ng StreptpL, 6 µg Plasmid-DNA (enthaltend die Maus-IL-2- oder die Maus-IFN- $\gamma$ -Sequenz) und 7.5 µg Tfpl transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen 2 x mit Ham's F10 Kulturmedium ohne Serum gewaschen. Anschließend wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen subkutan in den Rücken von 6 anästhesierten DBA/2 Mäusen verabreicht. Zur Kontrolle erhielt eine weitere Gruppe von 6 DBA/2 Mäusen  $1 \times 10^5$  M-3 Zellen, die nicht transfiziert worden waren. Das Tumorwachstum an der Injektionsstelle wurde wöchentlich kontrolliert. Fig. 8 zeigt den Verlauf der Tumorbildung.

### Beispiel 8

#### Induktion einer systemischen Immunantwort gegen Melanom durch Immunisierung mit zytokintransfizierten, bestrahlten Tumorzellen ("Prophylaktisches Mausmodell")

a) M-3 Melanomzellen ( $3 \times 10^5$  Zellen pro T25 Kulturflasche) wurden mit  $3 \times 10^9$  8-Methoxypsoralen/UV aktivierten Adenoviruspartikeln dl1014, 6 ng StreptpL, 6 µg IL-2 Plasmid-DNA oder pSP Plasmid-DNA, die kein cDNA Insert enthält und daher nicht zur Expression eines Genproduktes in den transfizierten Zellen führt, und 6.8 µg Tfpl transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden die Transfektionskomplexe entfernt und frisches, Serum enthaltendes Medium hinzugefügt. Dann wurden die

Zellen 6 h nach der Transfektion mit Röntgenstrahlen einer Dosis von 20 Gy bestrahlt und weitere 18 h kultiviert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und 2 x mit Earl's gepufferter Salzlösung (EBSS) gewaschen und die Kultur auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Anästhesierte DBA/2 Mäuse wurden mit  $1 \times 10^5$  Zellen, die subkutan in den Rücken verabreicht wurden, immunisiert. Parallel dazu wurde eine Gruppe von 6 Mäusen mit nicht-transfizierten M-3 Zellen immunisiert, die bestrahlt und weiter behandelt worden waren wie die transfizierten Zellen. Eine Woche nach den ersten Immunisierungen erhielten die Mäuse Boosterimmunisierungen mit Zellzubereitungen, wie sie für die ersten Immunisierungen verwendet worden waren. Nach einer weiteren Woche wurden die Tiere der hochtumorigenen Dosis von  $1 \times 10^5$  M-3 Zellen ausgesetzt, die an einer Stelle appliziert wurde, die von den früheren Immunisierungsstellen entfernt lag. Zusätzlich wurden 4 Mäuse, die nicht immunisiert worden waren, auf gleiche Art den tumorigen Zellen ausgesetzt. 8 Wochen nach der Tumorzellimplantation hatten alle (4/4) nicht immunisierten Tiere Tumore entwickelt, während alle Mäuse, die mit den bestrahlten, IL-2 transfizierten M-3 Zellen immunisiert worden waren, frei von Tumoren waren (0 Tumore in 5 Tieren). Die Mäuse, die mit bestrahlten, nicht transfizierten M-3 Zellen und mit bestrahlten M-3 Zellen, die mit einem "leeren" Plasmid (pSP) transfiziert worden waren, waren nur teilweise geschützt (4 von 6 Mäusen entwickelten Tumore). Die Entwicklung der Tumore in den Tieren ist in Tabelle II und in Fig. 9 zusammengefaßt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß die Immunisierung von Mäusen mit IL-2 transfizierten, bestrahlten Tumorzellen eine systemische Immunantwort induziert, die die Tiere vor weiterer Tumorentwicklung schützt.

b) In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Mäuse nach demselben Immunisierungsprotokoll mit bestrahlten M-3 Zellen behandelt, die mit Komplexen transfiziert worden waren, die  $3 \times 10^9$  8-Methoxypsoralen/UV-inaktivierte Adenoviruspartikel dl1014, 600 ng StreptpL, a) 6 µg IL-2 Plasmid pBCMGneo-mIL-2 (IL-2 100 %), b) 5.4 µg pSP Plasmid und 0.6 µg IL-2 Plasmid (IL-2 10 %), c) 5.4 µg IL-2 Plasmid und 0.6 µg IFN-γ Plasmid (IL-2 90 % + IFN-γ 10 %) oder d) 5.4 µg pSP Plasmid und 0.6 µg IFN-γ Plasmid (IFN-γ 10 %), und 4.7 µg TfpL enthielten. Darüberhinaus wurde eine Gruppe von Mäusen mit bestrahlten M-3 Zellen immunisiert, die transfiziert worden waren mit  $3.6 \times 10^9$  inaktivierten Adenoviruspartikeln dl312, 600 ng StreptpL, 6 µg IL-2 Plasmid und 4.7 µg TfpL (IL-2 100 % dl312). Eine Woche nach der Boosterinjektion wurden den immunisierten Tieren und, zur Kontrolle, auch den nicht-immunisierten Tieren  $1 \times 10^5$  M-3 Zellen implantiert. Die Entwicklung der Tumore ist in Tabelle III zusammengefaßt.

c) Nach demselben Immunisierungsprotokoll wie in den vorangegangenen Versuchen wurden die Mäuse mit bestrahlten M-3 Zellen behandelt, die transfiziert worden waren mit Komplexen, enthaltend  $3 \times 10^9$  8-Methoxypsoralen/UV-inaktivierte Adenoviruspartikel dl1014, 600 ng StreptpL, a) 6 µg IL-2 Plasmid = 100 % IL-2, b) 5.76 µg pSP Plasmid und 0.24 µg IL-2 Plasmid = 4 % IL-2, oder c) 6 µg pSP Plasmid und 4.7 µg TfpL. Die Produktion von IL-2 durch die transfizierten, bestrahlten Zellen wurde am Tag der Immunisierung gemessen: M-3 Zellen, die mit 100 % IL-2 Plasmid transfiziert worden waren, produzierten 33.000 Einheiten IL-2 pro  $1 \times 10^6$  Zellen und 24 h, während M-3 Zellen, transfiziert mit 4 % IL-2 Plasmid, 396 Einheiten IL-2 pro  $1 \times 10^6$  Zellen und 24 h produzierten. Eine Woche nach der Boosterinjektion wurden in die immunisierten Tiere und,

zur Kontrolle auch in die nicht-immunisierten Tiere  $1 \times 10^5$  M-3 Zellen implantiert. Um mehr Information über das Ausmaß der Immunantwort zu bekommen, die durch die Immunisierungen bei Verwendung verschiedener Mengen IL-2 Plasmid induziert wird, wurden weiteren Gruppen von Mäusen  $3 \times 10^5$  M-3 Zellen bzw.  $1 \times 10^6$  M-3 Zellen implantiert. Um zu zeigen, daß die Immunantwort tumorspezifisch ist, wurden einer Gruppe von Mäusen die mit 100 % IL-2 transfizierten, bestrahlten M-3 Zellen immunisiert worden war,  $1 \times 10^5$  syngenetische Plattenepithelkarzinomzellen KLN 205 (ATCC No. CRL 1453) implantiert. Die Entwicklung der Tumore ist in Tabelle IV gezeigt.

#### Beispiel 9

##### Gentransfer in Zellen einer epidermoiden Karzinomzelllinie

KB-Zellen wurden in einer Dichte von 400000 Zellen pro 6 cm Schalen gezüchtet und mit verschiedenen Komplexen transfiziert, die  $2.5 \times 10^9$  Adenoviruspartikel dl312, 200 ng StrepttpL, 6 µg pCMVL-DNA und wahlweise 3.8 µg Polylysin, 3.8 µ EGF-pL (Menge auf Polylysingehalt bezogen), oder 6 µg Tfpl enthielten. Die Komplexe (je 500 µl) wurden mit 1.5 ml Medium entweder mit oder ohne 2 % FCS gemischt. In Kompetitionsexperimenten wurden noch je 1 µg EGF zu der Mischung aus Komplexen und Medium zugegeben. Die Komplexe mit Medium wurden zu den Zellen zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium entfernt und frisches, Serum enthaltendes Medium beigegeben.

Ernten der Zellen nach 24 h und Luciferaseassay gab folgendes Ergebnis (Fig. 10A: Experiment mit 2 % FCS, Fig. 10B: Experiment ohne FCS): Fig. 10A: Mit EGFP-L wurde ein Wert von 20845000 Lichteinheiten erhalten; dieser

Wert war erheblich höher als mit Tfpl (3970000) oder Polylysin (pLys 10550000). Im Kompetitionsversuch mit freiem EGF wurde im Gegensatz zu den Experimenten mit Tfpl (Tfpl+EGF 12350000 Lichteinheiten) oder Polylysin (pLys+EGF 14055000) die erwartete Verringerung des Signals (EGFpL+EGF 14150000) gefunden. Dies zeigt, daß der verstärkte Gentransfer Liganden-spezifisch über den EGF-Rezeptor verläuft. Im Experiment ohne FCS (Fig. 10B) war der Effekt von EGFpL noch ausgeprägter (EGFpL 15150000, Tfpl 2000000, pLys 5100000, EGFpL+EGF 5900000 Lichteinheiten). Die Expressionswerte beziehen sich auf 50 % der Zellen.

Analog wurden KB-Zellen mit Komplexen transfiziert, die  $5 \times 10^9$  8-Methoxypsoralen/UV-inaktivierte Adenoviruspartikel dl1014 enthielten; es wurden vergleichbare Luciferaseexpressionswerte erhalten.

#### Beispiel 10

##### IL-2 Expression unter Verwendung verschiedener Vektoren

###### a) M-3 Zellen

$3 \times 10^5$  M-3 Zellen wurden mit verschiedenen Plasmidkonstrukten, die als Bestandteil ternärer Komplexe vorlagen, transfiziert. 3  $\mu$ l Adenovirus dl312 Präparation, 0.3  $\mu$ l (ca. 200 ng) StreptpL, 6  $\mu$ g Tfpl und 6  $\mu$ g Plasmid-DNA (BCMGneo-mIL-2, pWS2m, BMGneo-mIL-2 oder pCM2) wurden mit HBS auf ein Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l gebracht.

Für die Versuche mit 8-Methoxypsoralen/UV-inaktiviertem Adenovirus dl1014 wurden folgende Transfektionskomplexe

eingesetzt: 9 µl Viruspräparation, 600 ng StreptpL, 6 µg TfpL, 6 µg BCMGneo-mIL-2.

Nach den in der Fig. 11 angegebenen Zeitabständen wurde die IL-2 Aktivität bestimmt. Für BCMGneo-mIL-2 wurden außerdem nach 48 Stunden 64.000 Einheiten und nach 28 Tagen 7.128 Einheiten erhalten (nicht in der Fig. gezeigt). Für pCM2 wurden nach 48 Stunden 3.227 Einheiten und nach 28 Tagen 950 Einheiten erhalten, für BMGneo-mIL-2 nach 24 Stunden 396 Einheiten, nach 48 Stunden 604 Einheiten, nach 7 Tagen 297 Einheiten und nach 14 Tagen 264 Einheiten (nicht in der Fig. gezeigt).

b) Fibroblasten

Primäre humane Fibroblasten wurden wie in a) mit IL-2 Konstrukten transfiziert und die IL-2 Expression an den in der Fig. 12 angegebenen Tagen nach der Transfektion bestimmt. Die Zusammensetzung des Transfektionsmediums war für BCMGneo-mIL-2 dieselbe wie für M-3 Zellen; ein identischer Transfektionskomplex wurde für BMGneo-mIL-2 hergestellt.

Beispiel 11

Melanomzellen, die auf ihrer Oberfläche HSA exprimieren, stimulieren eine Immunantwort mit Schutzwirkung gegen nicht-modifizierte Tumorzellen

M3-Zellen wurden in Ham's F12-Medium plus 12.5 % Pferdeserum, 2.5 % FCS auf Gelatine-überzogenen Plastikschalen gezüchtet. 24 h vor der Transfektion wurden die Zellen zu  $3 \times 10^5$  in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche plattiert. Die Transfektionskomplexe für diese Zellmenge wurden hergestellt, indem 9 µl biotinyliertes,

8-Methoxypsoralen/UV-inaktiviertes Adenovirus dl1014 ( $1.4 \times 10^{12}$  Partikel/ml), 5.2 µg Transferrin-Polylysin, 800 ng Streptavidin-Polylysin und 6 µg der jeweiligen Plasmid-DNA (pSP, pWS2m in Kombination mit pSP, pHSA in Kombination mit pSP bzw. IL-2 in Kombination mit pHSA) in einem Gesamtvolumen von 500 µl vereinigt wurden. Dieses Volumen wurde jeder Kulturflasche in 2 ml Ham's F12 Medium plus 12.5 % Pferdeserum/2.5 % FCS zugegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurden das Medium durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bestrahlt (20 Gy). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, 2 x mit HBSS (Hank's Buffered Saline Salts) gewaschen, gezählt und zu 100.000 Zellen in 100 µl HBSS wieder aufgenommen. Diese Zellen bildeten das Vakzin, das innerhalb von 60 min für die Injektion in die Empfängermause verwendet wurde.

Die Mäuse wurden injiziert, wie in den vorangegangenen Beispielen beschrieben. Es wurden im Abstand von einer Woche zwei getrennte Vakzininjektionen mit je 100.000 Zellen an zwei verschiedenen Stellen des Rückens durchgeführt. Eine Woche nach der zweiten Injektion wurden die Mäuse mit 300.000 nicht-modifizierten, nicht-bestrahlten M3-Zellen in 300 µl HBSS an einer dritten Stelle des Rückens injiziert. Die Entwicklung der Tumore wurde in einwöchigen Abständen kontrolliert.

Fig. 13 zeigt das Ergebnis dieser Versuche (auf der Abszisse ist die Anzahl der Tage angegeben, auf der Ordinate die Tumogröße in mm<sup>3</sup>. Die Zahlen neben den Endpunkten bedeuten die Anzahl der Mäuse mit Tumoren im Vergleich zur Gesamtzahl der Mäuse in jeder Gruppe. pSP: 6 µg pSP; 80 IL-2/20 pSP: 4.8 µg pWS2m plus 1.2 µg pSP; 20 HSA/80 pSP: 1.2 µg pHSA plus 4.8 µg pSP; 80 IL-2/20 HSA: 4.8 µg pWS2m plus 1.2 µg pHSA): Die Impfung mit bestrahlten, mit dem Leervektor pSP

transfizierten M3-Zellen schützte nicht gegen Tumorzustand; in 4 von 6 Mäusen wurden beträchtliche Tumormassen gebildet. Die IL-2 produzierenden Zellen bewirkten einen nur mäßigen Rückgang der Tumore bei allen Mäusen in der Gruppe (3/3), die Tumore entwickelte. (Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, daß die Versuchsbedingungen im Hinblick auf die Testung der vorteilhaften Wirkung von HSA gewählt wurden, indem Mäuse eingesetzt wurden, denen die dreifache Dosis von Tumorzellen bei einer verringerten Dosis von IL-2-DNA verabreicht wurde.) Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse, die mit HSA exprimierenden M3-Zellen geimpft worden waren, ein stark unterdrücktes Tumorzustand. Die Mäuse, die eine Impfung mit sowohl HSA als auch IL-2 exprimierenden M3-Zellen erhalten hatten, entwickelten mit stark verminderter Häufigkeit Tumore (2 von 6), und die gebildeten Tumore waren klein im Vergleich zu den Kontrolltumoren (Impfung mit pSP-transfizierten Zellen); die durchschnittliche Größe betrug 18 mm<sup>3</sup> im Vergleich zu 1149 mm<sup>3</sup>.

#### Beispiel 12

Melanomzellen, die auf ihrer Oberfläche das Rabies-Neoantigen exprimieren, stimulieren eine Immunantwort mit Schutzwirkung gegen nicht modifizierte Tumorzellen.

M3-Zellen wurden, wie im Beispiel 11 beschrieben, behandelt und transfiziert. Lediglich die Einwirkungszeit der Transfektionskomplexe, die genauso wie im Beispiel 11 hergestellt wurden (6 µg Plasmid-DNA) auf die Zellen betrug vier anstelle von zwei Stunden. Die Injektionen in die Mäuse wurden ebenfalls analog zu Beispiel 11 durchgeführt, mit dem Unterschied, daß der Abstand zwischen den Injektionen von einer auf zwei Wochen

verlängert wurde und das Injektionsvolumen immer 100 µl betrug.

Fig. 14 zeigt das Ergebnis der Versuche, der Aufbau der Graphik ist analog zu Fig. 13 gehalten. Die pSP-Negativkontrolle zeigt das erwartete, beträchtliche Tumorwachstum. Die Positivkontrolle, bei der nur pWS2m (=100 % IL-2) transfiziert wurde, zeigt vollständigen Schutz; die transfizierten Zellen produzierten in den 24 h nach der Transfektion und vor der Injektion 45.000 IL-2 Einheiten/10<sup>6</sup> Zellen. Bei der Gruppe Mäuse, die nur 50 % pWS2m erhalten hatten (mit 50 % Leervektor pSP) war ein unvollständiger Schutz zu beobachten. Dieser wurde signifikant verbessert, wenn anstelle des Leervektors das Rabiesexpressionsplasmid pWS-RABIES co-transfiziert wurde. Ein schwaches Tumorwachstum zwischen Woche 2 und 4 ging ab Woche 5 zurück.

### Beispiel 13

#### Vergleich verschiedener Methoden zur Inaktivierung von Adenoviren

Es wurden im Rahmen dieses Beispiels verschiedene Methoden angewendet und hinsichtlich der Reduktion des Virustiters und der Fähigkeit der inaktivierten Viren, den Gentransfer über Rezeptor-vermittelte Endozytose zu verstärken, verglichen. Ferner wurde untersucht, welche Virusgene durch die Inaktivierung ausgeschaltet werden.

- a) Testung der Inaktivierung von Adenoviren mit 8-Methoxypsoralen
  - i) Inaktivierung der Viren

Proben von biotinyliertem Adenovirus dl1014 (300 µl) in HBS/40 % Glycerin wurden in die 4 Vertiefungen einer Zellkulturschale (NUNC, Katalog Nr. 176740) gegeben. Aliquots von 33 mg/ml 8-Methoxypsoralen in DMSO wurden den Viren beigegeben, so daß die gewünschten Endkonzentrationen erhalten wurden. Die Proben wurden mit geschlossenem Deckel auf Eis gegeben und wie unter e) iv) bei den Methoden beschrieben, 25 min lang UV bestrahlt, wobei die Position der Probenplatte alle 10 min verändert wurde, um Schatten zu vermeiden. Nicht reagiertes Psoralen wurde mittels Gelfiltration entfernt: dazu wurde die Virus/Psoralenprobe (2 ml) auf eine Pharmacia PD-10-Gelfiltrationssäule (vorequilibriert mit 30 ml HBS/40 % Glycerin) aufgebracht. Die Probe mit 0.5 ml HBS/40 % Glycerin in die Säule gewaschen und das Virus mit HBS/40 % Glycerin eluiert, wobei die ersten 400 µl verworfen und die folgenden 4 ml in 0.5 ml Fraktionen gesammelt wurden. Um die Virusfraktionen zu identifizieren, wurde ein Ninhydrinassay durchgeführt, die positiven Fraktionen vereinigt, die Proteinkonzentration gemessen und das Virus in Aliquots bei -70°C tiefgefroren.

ii) Titration von 8-Methoxypsoralen (CPE gegenüber Gentransfer)

Die Titrationen wurden durchgeführt, um die optimale Psoralenkonzentration festzustellen, die bei vollständiger Virusinaktivierung die DNA-Transportkapazität des Virus nicht beeinträchtigt. (Es gibt Berichte, wonach eine schlechte Inaktivierungsleistung erzielt wird, wenn Psoralene in Konzentrationen nahe der Sättigung eingesetzt werden, während wesentlich bessere Leistungen bei niedrigeren Konzentrationen erzielt werden. Dies könnte entweder auf ein Kristallisationsphänomen, welches die Verbindung aus

der Lösung entfernt, oder auf einen Filtereffekt zurückgeführt werden, letzteres weil hohe Konzentrationen von nicht-gebundenen Verbindungen die UV-Strahlung absorbieren und somit die Aktivierung von DNA-gebundenem Material durch UV blockieren.)

Der CPE-Assay ("Zytopathischer Endpunktassay" oder "Cytopathic Effect Assay"; Precious und Russell, 1985) zur Bestimmung des Virustiters wurde unter Verwendung von W162-Zellen, die zu 50.000 Zellen/Vertiefung auf Platten mit 24 Vertiefungen ausgebracht wurden, durchgeführt. Die Serienverdünnungen der Proben wurden in DMEM/2 % hitzeinaktiviertes Pferdeserum vorgenommen und das verdünnte Virus in 500 µl DMEM/2 % hitzeinaktiviertes Pferdeserum auf die Zellen aufgebracht. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurde das Medium durch frisches DMEM/10 % FCS ersetzt. Nach 4 bis 5 Tagen bei 37°C wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

Die Eignung der Inaktivierungsmethode im Hinblick auf den Gentransfer wurde anhand des Imports des Luciferasegens in K562-Zellen (ATCC No. CCL 243) getestet. Die Transfektionen mit Hilfe von Kombinationskomplexen wurden durchgeführt, wie in der WO 93/07283 beschrieben, wobei 9 µl Adenovirus dl1014 ( $1.4 \times 10^{12}$  Partikel/ml) bzw. bei Inaktivierung mit β-Propiolacton 13.5 µl ( $9.3 \times 10^{11}$  Partikel/ml), 800 ng Streptavidin-Polylysin, 6 µg pCMVL-DNA und 5.2 µg Transferrin-Polylysin in 500 µl HBS verwendet wurden (die Komplexe wurden hergestellt, wie bei den Methoden unter f) beschrieben). Außerdem wurde der relative Titer jeder Viruszubereitung mittels CPE-Assay auf W162-Zellen bestimmt. Das Ergebnis dieser Titrationen ist in Fig. 15 dargestellt: die Ziffern links in der Figur beziehen sich auf den relativen Virustiter (gefüllte Dreiecke), die Ziffern rechts in der Figur

beziehen sich auf Luciferaselichteinheiten (offene Quadrate). Auf der Abszisse ist die Konzentration von 8-Methoxypsoralen in mg/ml aufgetragen. Es zeigte sich, daß eine Behandlung des Virus mit 0.11 mg/ml 8-Methoxypsoralen eine Verringerung des Titers hervorruft, die sich von der in Vorversuchen mit einer Konzentration von 0.33 mg/ml verursachten nicht unterscheidet. Die DNA-Transportaktivität wird bei dieser Konzentration beibehalten. Unter den gewählten Bedingungen war eine 8-Methoxypsoralen-Konzentration von 0.033 mg unwirksam. (Die empfindlichere Analyse mittels Plaque-Assay, s. Fig. 19, ergab, daß Konzentrationen von 0.11 und 0.33 mg/ml 8-Methoxypsoralen vergleichbare Abnahmen im Virustiter hervorrufen.)

b) Testung der Inaktivierung von Adenoviren mit 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen

i) Inaktivierung der Viren

Das weniger hydrophobe Psoralenderivat 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen ist geladen; es interagiert mit und inaktiviert in der Folge davon einzelsträngige RNA-Viren ebenso wie DNA-Viren und ist zu 5 mg/ml in wässrigen Lösungen lösbar. Das eingesetzte 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen wurde von H.R.I. (Katalog Nr. 6) bezogen und zu 5 mg/ml in HBS aufgelöst. Nachdem Aliquots davon den Virusproben beigegeben worden waren, wurden die Inaktivierung des Virus und die Reinigung analog wie für 8-Methoxypsoralen durchgeführt.

ii) Titrations von 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (CPE gegenüber Gentransfer)

Die Titrations wurden durchgeführt, genau wie unter a) ii) für 8-Methoxypsoralen beschrieben. Das Ergebnis

dieser Titrationen ist in Fig. 16 dargestellt: die Ziffern links in der Figur beziehen sich auf den relativen Virustiter (gefüllte Dreiecke), die Ziffern rechts in der Figur beziehen sich auf Luciferaselichteinheiten (offene Quadrate). Auf der Abszisse ist die Konzentration von 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen in µg/ml aufgetragen. Mit 0.3 und 1 mg/ml 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen wurden Bedingungen gefunden, die einen Titerabfall von mindestens 5 log hervorrufen, während die Effizienz des DNA-Transfers beibehalten wird. Niedrigere Konzentrationen von 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (<0.1 mg/ml) rufen einen nur mäßigen Abfall des Virustiters hervor. Der Plaque-Assay (s. Fig. 19) zeigte ebenfalls, daß Konzentrationen von ca. 1.0 und 0.3 mg/ml 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen Verringerungen des Virustiters hervorrufen, die von den mit 0.11 und 0.33 mg/ml 8-Methoxypsonalen bewirkten nicht unterscheidbar sind. Die Gentransferkapazität des inaktivierten Virus wurde bestimmt, wie unter a) ii) beschrieben. Außerdem wurde der relative Titer jeder Viruszubereitung mittels CPE-Assay auf W162-Zellen bestimmt.

c) Testung der Inaktivierung von Adenoviren mit β-Propiolacton

i) Inaktivierung der Viren

Die Virusproben wurden auf 0.3 M HEPES, pH 7.9 eingestellt, bevor die 10fach konzentrierten β-Propiolacton-Lösungen zugegeben wurden. Konzentrierte β-Propiolacton-Lösungen wurden hergestellt, indem β-Propiolacton (Sigma, Katalog Nr. P5648) unmittelbar vor dem Gebrauch mit HBS verdünnt wurde. Es wurden Kontrollversuche durchgeführt, um zu zeigen, daß

0.3 M HEPES, pH 7.9 ausreichend war, um die  $\beta$ -Propiolacton-Behandlung bei 1 % abzupuffern. Aliquots von  $\beta$ -Propiolacton wurden bei Raumtemperatur den gepufferten Viruslösungen beigegeben, dann wurden die Virusproben 4 h lang bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie entweder bei -70°C gelagert oder für die Transfektionsexperimente verwendet wurden.

ii) Titration von  $\beta$ -Propiolacton (CPE gegenüber Gentransfer)

Die Adenoviren wurden 4 h lang bei Raumtemperatur verschiedenen Konzentrationen von  $\beta$ -Propiolacton ausgesetzt. Im übrigen wurden die Versuche durchgeführt, wie für die Psoralenderivate beschrieben. Es zeigte sich (Fig. 17), daß die Behandlung mit 0.3 %  $\beta$ -Propiolacton einen Abfall des Virustiters um beinahe 5 log hervorruft, während die DNA-Transportaktivität beibehalten wird. Konzentrationen von 1 % und höher bewirken einen noch stärkeren Titerabfall, wobei sich jedoch auch der DNA-Transport verschlechtert. (Die Ziffern links in der Figur beziehen sich auf den relativen Virustiter (gefüllte Dreiecke), die Ziffern rechts in der Figur beziehen sich auf Luciferaselichtseinheiten (offene Quadrate). Auf der Abszisse ist die Konzentration von  $\beta$ -Propiolacton in % aufgetragen.)

iii) Gentransferkapazität des Adenovirus nach mehreren  $\beta$ -Propiolacton-Behandlungen bei niedriger Konzentration

Die in ii) beobachtete starke Abnahme der DNA-Transferaktivität mit Konzentrationen zwischen 0.3 % und 1 %  $\beta$ -Propiolacton ließ vermuten, daß bei der niedrigeren Konzentration eine Modifikation bevorzugt von viralen Nukleinsäuren auftritt, während das Mittel bei den höheren Konzentrationen die Kapsidproteine zu

modifizieren und die endosomolytische Aktivität des Virus zu schädigen beginnt. Um die Richtigkeit dieser Vermutung zu prüfen, wurden die Adenoviren mit mehreren Aliquots von niedrigeren (<0.3 %)  $\beta$ -Propiolacton-Konzentrationen behandelt, in der Hoffnung, dadurch bevorzugt eine Modifikation der Virus-DNA zu bewirken, ohne das Virusprotein zu schädigen. Dazu wurden Virusproben mit einer Gabe  $\beta$ -Propiolacton zu 0.3 %, zwei Gaben  $\beta$ -Propiolacton zu 0.3 %, drei Gaben von  $\beta$ -Propiolacton zu 0.2 %, vier Gaben von  $\beta$ -Propiolacton zu 0.15 % oder mit einer Gabe von  $\beta$ -Propiolacton zu 1 % behandelt. Die Gentransferaktivität dieser Viruspräparationen, die in Kombinationskomplexe eingebaut wurden, wie unter f) beschrieben, wurde mit K562-Zellen getestet, wie oben beschrieben. Wie in Fig. 18 gezeigt ist, verursachten außer der 1 % Probe alle Behandlungen einen Abfall der Gentransferkapazität von weniger als 1 log. Die Behandlung mit 1 %  $\beta$ -Propiolacton verursachte einen Abfall von mehr als 2 log. (Probe 1: nicht-inaktiviertes Virus. Probe 2: Inaktivierung mit 0.11 mg/ml 8-Methoxypsoralen. Probe 3: Inaktivierung mit 0.3 %  $\beta$ -Propiolacton. Probe 4: Inaktivierung mit 2 x 0.3 %  $\beta$ -Propiolacton. Probe 5: Inaktivierung mit 3 x 0.2 %  $\beta$ -Propiolacton. Probe 6: Inaktivierung mit 4 x 0.15 %  $\beta$ -Propiolacton. Probe 7: Inaktivierung mit 1 %  $\beta$ -Propiolacton. Die Zahlen bei den Balken bedeuten Luciferaselichteinheiten.)

d) Bestimmung der Replikationsfähigkeit inaktivierter Adenoviren mittels Plaque-Assay

- i) Vergleich der Plaque-Assays von Adenovirus dl1014, inaktiviert mit 8-Methoxypsoralen,  $\beta$ -Propiolacton oder 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen

Der Plaque-Assay dient einer empfindlicheren Bestimmung der Replikationsfähigkeit des Virus: Adenovirus 5 benötigt das Eindringen von 10 bis 50 Viruspartikeln, um eine infizierte Zelle zu erzeugen. Der im folgenden dargestellte CPE-Assay mißt die Fähigkeit chemisch inaktivierter Viren, eine zytopathische Virusinfektion auszulösen, was aber die Infektion von mindestens 10 % der Zielpopulation erfordert, um während der vier Tage, die der Assay dauert, nachgewiesen werden zu können. Dieser Assay erlaubt somit den Nachweis von 50.000 Viruspartikeln. Demgegenüber kann unter optimalen Bedingungen mit Hilfe des Plaque-Assays ein einzelner Plaque nachgewiesen werden, der als Folge des Eindringens von 10 bis 50 Viren entstanden ist; der Test ist also ca. 1.000 x empfindlicher als der CPE-Assay.

Für die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Plaque-Assays wurde die folgende Methode angewendet: W126-Zellen wurden 18 h vor Beginn des Assays zu 500.000 Zellen pro Vertiefung einer Platte mit 6 Vertiefungen ausplattiert. Dann wurde das Medium entfernt und durch frisches Medium (2 % Pferdeserum/DMEM) plus die jeweilige Virusverdünnung ersetzt, wobei das Virus gleichmäßig auf alle Zellen verteilt wurde. Daraufhin wurden die Platten 1.5 h lang bei 37°C inkubiert, wobei die Platte alle 20 min vorsichtig geschwenkt wurde. Inzwischen wurde eine 2X Agaroselösung (2 % (2 g/100 ml) SeaPlaque-Agarose niedriger Geliertemperatur (FMC Katalog Nr. 5010), in 5 mM HEPES pH 7.4, vor dem 25 minütigen Autoklavieren pH-eingestellt) auf 70°C erhitzt, um die Agarose zu schmelzen und anschließend bei 37°C equilibriert. Auf ähnliche Weise wurde eine 2X DMEM/10 % FCS-Lösung hergestellt (doppelte Konzentration DMEM/doppelte Konzentration Penicillin/Streptomycin/doppelte Konzentration Glutamin/10 % FCS (hitzeinaktiviert bei

56°C, 30 min)). Am Ende der 1.5 stündigen Inkubation der Zellen mit dem Virus wurde ein 50 ml Batch einer Überschichtung (25 ml 2X Agarose + 25 ml 2X DMEM/10 % FCS in einem 50 ml Falcon-Röhrchen) hergestellt. Die Medium/Virus-Lösung wurde von einer Platte entfernt und je 3.5 ml Überschichtung in jede Vertiefung gegeben. Dann wurden die Platten mindestens 30 min lang ungestört bei Raumtemperatur stehengelassen, um die Agarose zu härten, bevor sie wieder bei 37°C inkubiert wurden. Am sechsten Tag nach der Viruszugabe wurde jede Vertiefung mit weiteren 2-3 ml der Überschichtungslösung überschichtet. Bei dieser Vorgangsweise werden die Plaques normalerweise am siebenten bis zehnten Tag sichtbar. Die Plaques wurden jeweils am vierzehnten bis achtzehnten Tag nach der Infektion gezählt.

Die Testung verschiedener inaktivierter Viruspräparationen mittels Plaque-Assay ergab, daß die β-Propiolacton-Behandlung (2 x 0.3 %) einen Abfall im Virustiter um ca. 5 log bewirkt (Fig. 19: Probe 1: nicht-inaktiviertes Virus, Probe 2: Inaktivierung mit 0.33 µg/ml 8-Methoxypsoralen, Probe 3: Inaktivierung mit 0.11 µg/ml 8-Methoxypsoralen, Probe 4: Inaktivierung mit 2 x 0.3 % β-Propiolacton, Probe 5: Inaktivierung mit 0.28 mg/ml 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen, Probe 6: Inaktivierung mit 0.83 mg/ml 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen. Die Zahlen bei den Balken bedeuten pfu's/ml). Keine Plaques wurden sowohl bei den 8-Methoxypsoralen-behandelten (0.33 oder 0.11 mg/ml) als auch bei den 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen-behandelten (0.28 oder 0.83 mg/ml) Adenoviren beobachtet. Bei einem Verdünnungsfaktor von 6 log zwischen den nicht-inaktivierten dl1014 (mit 1 x 10<sup>8</sup> pfu/ml) und den Psoralen-inaktivierten Proben zeigt dies, daß in den Psoralen-inaktivierten Proben weniger als 10<sup>2</sup> Plaquebildende Einheiten (pfu's) vorhanden sind. Die

wesentliche Beobachtung dabei ist, daß  $\beta$ -Propiolacton-inaktivierte Viren Plaques mit nachweisbarer Häufigkeit bilden. Wenn also auch die  $\beta$ -Propiolacton-Inaktivierung im CPE-Assay der Psoralen-Inaktivierung ebenbürtig erscheint - im Plaque-Assay kommt ein deutlicher Unterschied zwischen den zwei Verbindungstypen zu Tage.

ii) Vergleich der Plaque-Assays von Adenovirus dl1014, inaktiviert mit 8-Methoxypsoralen oder verschiedenen  $\beta$ -Propiolacton-Behandlungen

Die Adenovirus dl1014-Präparationen wurden mit verschiedenen Mehrfachzugaben von  $\beta$ -Propiolacton (s. Fig. 20) inaktiviert, mittels Plaque-Assay analysiert und mit Adenoviren, die mit 0.11 mg/ml 8-Methoxypsoralen inaktiviert worden waren, verglichen. (Probe 1: nicht-aktiviertes Virus, Probe 2: Inaktivierung mit 0.11  $\mu$ g/ml 8-Methoxypsoralen, Probe 3: Inaktivierung mit 0.3 %  $\beta$ -Propiolacton, Probe 4: Inaktivierung mit 2 x 0.3 %  $\beta$ -Propiolacton, Probe 5: Inaktivierung mit 3 x 0.2 %  $\beta$ -Propiolacton, Probe 6: Inaktivierung mit 4 x 0.15 %  $\beta$ -Propiolacton, Probe 7: Inaktivierung mit 1 %  $\beta$ -Propiolacton. Die Zahlen bei den Balken bedeuten pfu's/ml.) Auch dieser Versuch, dargestellt in Fig. 20, ergab keinen Nachweis von Viren in der Psoralen-behandelten Probe. Der Verdünnungsfaktor von 7 log zwischen nicht-inaktiviertem dl1014 von  $6.7 \times 10^8$  pfu/ml und dem Psoralen-inaktivierten Virus ergibt, daß in der Psoralen-inaktivierten Probe weniger als  $6.7 \times 10^1$  pfu's vorhanden sein müssen. Im Gegensatz dazu wurden in allen  $\beta$ -Propiolacton-behandelten Proben Plaques nachgewiesen, was einer Inaktivierung von ca. 2 log (0.3 %  $\beta$ -Propiolacton) bis 5 log (2 x 0.3 %  $\beta$ -Propiolacton) entspricht. Obwohl 1 %  $\beta$ -Propiolacton einen starken Abfall in der DNA-Transportaktivität hervorrief (vgl. Fig. 17), bewirkte es nur einen mäßigen Abfall des

Virustiters, was für die Annahme spricht, daß die höhere  $\beta$ -Propiolacton-Konzentration die Proteinmodifikation gegenüber der DNA-Modifikation bevorzugt und daher stärker die Fähigkeit des Virus, Endosome aufzubrechen (und somit den Viruseintritt) beeinträchtigt, als die Virusreplikation.

e) Genexpression vom inaktivierten Virus

Es wurden verschiedene Kombinationskomplexe entsprechend der bei den Methoden unter f) beschriebenen Vorschrift, enthaltend optimale Mengen von Adenovirus dl312, 8-Methoxypsoralen-inaktiviertem dl312, Adenovirus dl1014, 8-Methoxypsoralen-inaktiviertem dl1014 und  $\beta$ -Propiolacton-inaktiviertem dl1014, hergestellt. Die Komplexe enthielten ca.  $1 \times 10^{10}$  Viruspartikel, 800 ng Streptavidin-Polylysin, 6  $\mu$ g pCMV-DNA und 5.2  $\mu$ g Transferrin-Polylysin in einem Endvolumen von 500  $\mu$ l HBS. Die Komplexe wurden auf K562-Zellen (24 h vorgezüchtet in 50  $\mu$ M Deferrioxamin/RPMI/10 % FCS, ausplattiert zu 250.000 Zellen/ml) zu 2 ml pro Vertiefung einer Platte mit 24 Vertiefungen aufgebracht. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Zellen in frisches Medium ohne Deferrioxamin gewaschen und 48 h später für die Bestimmung der Luciferaseaktivität geerntet oder einer RNA-Analyse auf ausgewählte Adenovirusgene unterworfen, wobei das vereinigte Material drei getrennten Transfektionen verwendet wurde.

Die Messungen der Luciferaseaktivität zeigten, daß alle Transfektionen eine Expression lieferten, die innerhalb einer Größenordnung lag.

i) Northern-Analyse

Die RNA-Northern-Analyse wurde nach der von Paeratakul et al., 1988, beschriebenen Methode durchgeführt: 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 3 x in HBS gewaschen und Serienverdünnungen entsprechend 30.000, 10.000 oder 3.000 Zellen auf ein Nitrozellulosefilter unter Verwendung eines 96 Proben Dot Blot Geräts (Schleicher & Schuell) aufgebracht. Daraufhin wurden die Zellen mit 1 % Glutaraldehyd in HBS 60 min lang bei 4°C fixiert, gefolgt von Proteinase K-Verdau (20 µg/ml) und 30 min in HBS/0.1 % SDS bei 37°C. Das Filter wurde dann in Church-Puffer (0.5 M Natriumphosphat, 7 % SDS, 1 mM EDTA pH 8) bei 65°C 5 h lang prähybridisiert, gefolgt von der Inkubation (über Nacht bei 65°C) mit den markierten DNA-Sonden in einem Minimalvolumen Church-Puffer. Anschließend wurden die Filter zweimal in 2X SSC/0.1 % SDS 30 min lang bei 65°C gewaschen, gefolgt jeweils von 30 min in 0.1X SSC, 0.1 % SDS. Das radioaktive Muster wurde durch Phosphorimaging sichtbar gemacht. Die radioaktiv markierten (<sup>32</sup>P) Sonden wurden aus PCR-Produkten von Adenovirus dl1014-Sequenzen hergestellt. Eine Ela-Sonde (383 bp) wurde unter Verwendung von PCR-Primern zu Ad5, bp 736 - 751 (Ela.1) und zu bp 1119 - 1101 (Ela.2) hergestellt. (Diese Sequenz ist ein Teil der Region, die in dl312 deletiert ist. Sie dient als Kontrolle; das RNA-Signal sollte in den dl312-Proben fehlen, jedoch in den dl1014-Proben enthalten sein, weil letzteres Virus eine Wildtyp E1-Region besitzt.) Eine E3-Sonde (436 bp) wurde vom am stärksten exprimierten E3-Gen, dem 19 K Glykoprotein-Gen (Gooding, 1992) unter Verwendung von Primern, die zu Ad5, bp 28722 - 28737 (E3.a) und 29157 - 29142 (E3.b) hergestellt (Die Expression von E3 dürfte eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf transfizierte Zellen spielen, weil mindestens zwei der E3-Gene die Oberflächenexpression von MHC Klasse I-Molekülen und TNF-Rezeptor-Molekülen auf der Oberfläche von infizierten Zellen modulieren.) Im

Anschluß an die PCR wurden die Reaktionsprodukte auf niedrigschmelzenden Agarosegelen in TAE-Puffer gereinigt, das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel herausgeschnitten, gewogen und in 1.3 ml Wasser/g Gelfragment aufgenommen. Das in Wasser aufgenommene Gelfragment wurde dann 10 min lang auf 95°C erhitzt und 10 µl der entstandenen Lösung 12 h lang bei Raumtemperatur mittels der Random Primer Methode (Feinberg und Vogelstein, 1984) radioaktiv markiert. Im Anschluß daran wurde die markierte DNA durch Ethanolfällung in Gegenwart von Ammoniumacetat und tRNA gereinigt.

Fig. 21 zeigt das Autoradiogramm: es wurde gefunden, daß bei den dl312-Proben, und zwar sowohl bei den nicht-inaktivierten als auch bei den 8-Methoxypsoralen-inaktivierten, keine Ela-Expression auftrat. Die Expression von Ela ist in den nicht-inaktivierten dl1014-Viren stark, fehlt jedoch komplett sowohl in den 8-Methoxypsoralen-behandelten als auch in den zweimal mit 0.3 %  $\beta$ -Propiolacton inaktivierten Viren. E3 ist in nicht-inaktivierten dl312-Adenoviren weniger stark exprimiert, als in dl1014. Dieser Befund ist in Einklang mit der Kenntnis der Funktion von Ela als positiver Modulator der E3-Expression und der Expression anderer früher Gene (Nevins, 1991 und 1992). In allen Fällen blockierte die Inaktivierung mit 8-Methoxypsoralen bzw. mit  $\beta$ -Propiolacton die RNA-Synthese von diesen Genen vollständig.

#### ii) Reverse Transkriptions-PCR-Analyse

Es wurde von Zellen ausgegangen, die, wie in den vorangegangenen Versuchen beschrieben, transfiziert worden waren, wobei entweder nicht-aktiviertes Adenovirus dl1014 oder 8-Methoxypsoralen-inaktiviertes dl1014

eingesetzt wurde. In beiden Transfektionen wurden identische Mengen von Virus eingesetzt. Die RNA-Reinigung wurde mit  $1 \times 10^6$  transfizierten M3-Zellen, geerntet 24 h nach der Transfektion durch Einbringen in PBS und kurzes Pelletieren in einer Eppendorf-Zentrifuge, durchgeführt. Die Zellpellets wurden in 1 ml Trisolv (= Phenol/Guanidinthiozyanat in einer Monophasenlösung; Bioteck) gelöst und kurz in einem Vortex gemischt. Darauf wurde Chloroform zugefügt (500  $\mu$ l), worauf zwei Phasen entstanden, von denen die wässrige die zelluläre RNA enthielt. Die RNA wurde aus der wässrigen Phase durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol ausgefällt, das Präzipitat durch Zentrifugation gesammelt, das Zellpellet mit 80 % Ethanol 1 x gewaschen und in 20  $\mu$ l RNase-freiem Wasser gelöst. In der RNA-Probe enthaltene kontaminierende DNA wurde durch Verdau mit RNase-freier DNase (Boehringer Mannheim; 60 min bei 37°C) entfernt. Die DNase wurde anschließend durch weitere Inkubation bei 95°C 5 min lang inaktiviert.

Die Reverse Transkriptions-Reaktionsansätze enthielten 10  $\mu$ l RNA-Lösung, 2  $\mu$ l 10 mM dNTPs, 4  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ l 10 X RT Puffer (100 mM Tris-HCl, 900 mM KCl, pH 8.3), 1  $\mu$ l 50  $\mu$ M oligo d(D)<sub>16</sub>, 1  $\mu$ l 20 Einheiten/ $\mu$ l RNase-Inhibitor (Perkin Elmer) und 1  $\mu$ l MuLV Reverse Transkriptase (Perkin Elmer). Reverse Transkriptase-Reaktionen wurden durchgeführt 10 min lang bei 25°C und 15 min bei 42°C, gefolgt von 5 min bei 95°C, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren.

Es wurden Primer verwendet, die den folgenden Abschnitten des Adenovirus 5 Genoms entsprechen: Ela up: bp 1228-1248, Ela down: bp 1545-1526, E3 up: bp 28722-28737, E3 down: 29157-29140.

Die Polymerase-Kettenreaktionsansätze enthielten 35 µl Wasser, 5 µl PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.9, 1 M KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl up- und down-Primer (25 mM), 0.5 µl Taq-Polymerase (5 Einheiten/µl, Boehringer Mannheim) und 6.5 µl der verdünnten cDNA-Sonden (RNA als Kontrollreaktion). Die Proben wurden 90 sek lang bei 95°C denaturiert, gefolgt von 35 Zyklen von 30 sek bei 95°C, 60 sek bei 60°C, 30 sek bei 72°C mit einer abschließenden Extension von 3 min bei 72°C. Die amplifizierten DNA-Produkte wurden auf einem 2 %igen Agarose TAE-Gel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Fig. 22 zeigt, daß beim nicht-inaktivierten Adenovirus die erwarteten PCR-Produkte von sowohl der Ela- als auch der E3-Region sichtbar sind, wobei das Signal bei einer Verdünnung von 1:1.000 der Zielnukleinsäure nachweisbar ist (obere Tafeln in der Figur). Im Gegensatz dazu war in den Proben, die vom Psoralen-inaktivierten Virus stammten, kein Signal nachweisbar. Das Fehlen des PCR-Signals in einer Kontrollprobe, in der die Reverse Transkriptasreaktion ausgelassen worden war, bestätigt, daß die beobachteten Signale auf die Amplifizierung der RNA zurückzuführen sind und nicht von einer Verunreinigung der Adenovirus-DNA in der Nukleinsäurepräparation.

f) Analyse der Bindung von 8-Methoxypsoralen an das Adenovirusgenom

i) Quantitative Bestimmung von an das Adenovirusgenom gebundenem 8-Methoxypsoralen

0.41 ml Tritium-markiertes 8-Methoxypsoralen (0.8 mCi/ml) wurden getrocknet, in 20 µl DMSO gelöst und mit 8.7 µl unmarkiertem 8-Methoxypsoralen (33 µg/µl in DMSO) gemischt. Diese Mischung wurde 1.8 ml biotinyliertem

Adenovirus dl1014 beigegeben. UV-Bestrahlung und Reinigung mittels PD-10 Chromatographie wurden durchgeführt, wie oben beschrieben. Der Einbau von  $^3\text{H}$  8-Methoxypsoralen wurde bestimmt, indem Aliquots des gereinigten Virus in Szintillationsflüssigkeit gezählt wurden. Berechnungen aufgrund der gemessenen Radioaktivität, die in die DNA eingebaut worden war, zeigten, daß ein Psoralenmolekül pro 800 Basenpaaren des Virus vorlag. Ergänzend wurde mittels dünnenschichtchromatographischer Analyse (Silicagel, Dichlormethan als Lösungsmittel) festgestellt, daß kein freies, nicht-reagiertes 8-Methoxypsoralen in der Probe blieb.

ii) Untersuchung der Lokalisierung der 8-Methoxypsoralen-Einlagerung im Virusgenom

Um zu bestimmen, ob die Einlagerungen von 8-Methoxypsoralen über das gesamte Virusgenom verteilt oder an bestimmten zugänglichen Stellen der Virus-DNA konzentriert sind, wurde die Virus-DNA gereinigt und mittels Restriktionsenzymen gespalten, um zehn oder elf DNA-Fragmente zu erhalten: Vom  $^3\text{H}$  8-Methoxypsoralen-markierten Virus wurde die DNA gereinigt, indem das Virus 45 min lang bei 56°C mit 0.4 % SDS/0.4 mg/ml Proteinase K inkubiert wurde. Die Probe wurde 2 x mit Phenol/Chloroform (1:1) und 1 x mit Chloroform extrahiert, die DNA aus der wässrigen Phase wurde nach Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat, pH 5, mit 0.54 Volumina Isopropanol präzipitiert. Die präzipitierte DNA wurde zentrifugiert, 2 x mit eiskaltem 80 %igen Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE gelöst. DNA-Aliquots von nicht-inaktiviertem Adenovirus oder von  $^3\text{H}$  8-Methoxypsoralen-markiertem Adenovirus wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII oder Asp718 nach Vorschrift des Herstellers (Boehringer Mannheim), aber mit 10fach

höheren Enzymmengen verdaut, mittels Phenol/Chloroform- und Chloroformextraktion gereinigt, mit Ethanol präzipitiert und in Gegenwart von Ethidiumbromid (Sambrook et al., 1991) auf einem 0.9 % Agarose/TAE-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet, imprägniert mit Szintillationsfluor (Enhance, Amersham) und mit einem Röntgenfilm in Kontakt gebracht. Fig. 23 zeigt das Ethidiumbromid-gefärzte Gel und das Fluorogramm; aus dem Markierungsmuster ist ersichtlich, daß  $^3\text{H}$ -8-Methoxypsoralen über das Genom verteilt ist. Mit wenigen Ausnahmen waren die Fragmente, erhalten aus dem Asp718- oder dem HindIII-Verdau, in einem Ausmaß markiert, das ihrer Länge proportional war. Zwei der HindIII-Fragmente, die nahe den Enden des Genoms lokalisiert sind, schienen eine verstärkte Markierung aufzuweisen. Im Gegensatz dazu wiesen Asp718-Fragmente aus ähnlichen Lagen im Genom eine solche präferentielle Markierung nicht auf. Insgesamt waren die 8-Methoxypsoralen-Vernetzungen gleichmäßig über das Virusgenom verteilt.

#### Beispiel 14

##### Ermittlung der für die Inaktivierung von Tumorzellen erforderlichen Strahlendosis

Dazu wurden je 6 mittlere Gewebekulturflaschen (T75) mit je  $6 \times 10^5$  humane Melanomzellen in 20 ml Normalkulturmöedium nach einem Tag mit 5, 10, 20, 25, 50, 75 oder 100 Gy bestrahlt; 6 Flaschen blieben unbestrahlt. Es wurde ein Bestrahlungsgerät der Bezeichnung Gammacell 40, No. 126, Type B(U), (Fa. Nordion International INC) verwendet, das 2 Gammazellen aus Cs-137 besitzt, die zusammen ca. 72.5 Gy/h liefern. 6 Tage nach der Bestrahlung wurden die Zellen je eine Flasche aus jeder Gruppe trypsinisiert, zentrifugiert, das Pellet

aufgenommen, 100 µl Zellsuspension mit Trypanblau versetzt und in der Zählkammer gezählt. Die restlichen Zellen wurden mit neuem Medium versetzt und in eine neue Kulturflasche gegeben (1. Passage). Eine Woche später wurde der Vorgang wiederholt; je eine Flasche aus jeder Gruppe wurde trypsinisiert, gezählt und die 1. Passage wurde als Kontrolle mitgezählt. Die nicht-bestrahlten und mit 5 Gy bestrahlten Zellen zeigten ein deutliches Wachstum. Nach weiteren einwöchigen Abständen wurde der Vorgang wiederholt, der Versuch wurde nach insgesamt 6 Wochen abgeschlossen. Für die Wachstumskurven wurde jeweils die höchste gezählte Zellzahl (in Original- oder Kontrollflaschen) verwendet. Ab einer Bestrahlungsdosis von 20 Gy zeigten weder die Originalflaschen noch die Kontrollflaschen Zellwachstum. Bei 10 Gy wurde ein Wachstum in den Originalflaschen beobachtet. Die Wachstumskurven sind in Fig. 24 dargestellt. Aufgrund der ermittelten Werte von drei verschiedenen Melanomzellkulturen wurde als sichere Strahlendosis für alle Experimente eine Dosis von 100 Gy gewählt.

#### Beispiel 15

Nachweis von Plasmid- und Adenovirus-DNA in vivo mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

In diesem Beispiel wurden folgende Methoden verwendet:

##### Infektion der Krebsvakzine:

M3 Melanomzellen wurden mit rekombinantem Maus-Interleukin-2 Plasmid unter Anwendung der Adenovirus-Transferrin-Methode, wie in Beispiel 8 c) beschrieben, transfiziert. Nach 24 h wurde die Zytokinproduktion bestimmt (20.000-50.000 Einheiten IL-2 in 24 h pro 1 Million Zellen). Die Zellen wurden trypsinisiert, in

serumfreiem Medium gewaschen und auf eine Konzentration von  $3 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen pro 100  $\mu\text{l}$  isotonische Salzlösung eingestellt. Je 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurden mit Hilfe einer Kanüle subkutan in die rechte Flanke von DBA/2 Mäusen injiziert (siehe auch die Beispiele 7 und 8).

#### Aufreinigung der Gewebeproben:

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion wurden die Mäuse getötet und die Injektionsstelle sowie verschiedene Gewebeproben entnommen. Diese Proben wurden mechanisch verkleinert und über Nacht in 1 ml Proteinase K Puffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1 % SDS, 0.5 mg/ml Proteinase K) bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit 0.5 Volumen Isopropanol präzipitiert. Die Proben, welche nun die gesamte zelluläre DNA enthielten, wurden mit 70 % Ethanol gewaschen und in TE-Puffer aufgenommen.

Zur Aufreinigung von peripheren mononukleären Blutzellen (PMBZs) wurde eine Herzpunktion durchgeführt. Das mit Citratpuffer (10 mM) versetzte Blut wurde anschließend durch einen Ficoll-Gradienten separiert und die PMBZs mit Proteinase K Puffer verdaut. DNA Reinigung erfolgte wie oben beschrieben.

#### Polymerase Kettenreaktion:

Die Reaktionsmischung setzte sich zusammen aus 1  $\mu\text{g}$  DNA, 1 x PCR-Puffer (Boehringer Mannheim), 1 mM Endkonzentration desoxy-Nukleotide, 3 Einheiten Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim) und 25 pmol der spezifischen Primer. Im Falle der Interleukin-2 Plasmid Amplifikation wurden zusätzlich 1.000 Kopien der internen Kontrolle zugefügt. PCR-Reaktionzeiten waren: 5 min bei 95°C zur Denaturierung, danach 40 Zyklen mit je 30 sek 94°C, 30 sek 60°C, 2 min 72°C. Danach wurden die

Amplifikationsprodukte mit Probenpuffer versetzt und in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt.

Die spezifischen Primer wiesen die folgenden Sequenzen auf:

IL-2 up (Position 99-122) (SEQ ID NO:3)

GTCAACAGCGCACCCACTTCAAGC.

IL-2 down (Position 548-526) (SEQ ID NO:4)

GCTTGTTGAGATGATGCTTGACA.

Adeno up (Position 1228-1248) (SEQ ID NO:5)

GGTCCTGTGTCTGAACCTGAG.

Adeno down (Position 1545-1525) (SEQ ID NO:6)

TTATGGCCTGGGGCGTTACA.

(Im Sequenzprotokoll wurde aus programmtechnischen Gründen für die synthetischen Oligonukleotide einheitlich als Art des Moleküls "cDNS" und als Schlüssel "5'UTR" angegeben.)

Die Nachweisgrenze der Amplifikationsprodukte liegt je nach Test zwischen 200 und 1.000 Kopien DNA.

a) Um rekombinante IL-2 DNA und Adenovirus dl1014 DNA an der Injektionsstelle zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Impfung nachzuweisen, wurden neun DBA/2 Mäuse mit je  $3 \times 10^5$  IL-2-Plasmid-transfizierten M3 Melanomzellen immunisiert. Nach 1, 2 und 5 Tagen wurden jeweils 3 Mäuse getötet und die Immunisierungsstellen ausgeschnitten. Die PCR-Analyse zeigte, daß schon nach 2 Tagen ein starker Abbau der IL-2 DNA einsetzt und nach 5 Tagen diese DNA nicht mehr nachweisbar ist. In einem analogen Experiment konnte aus der Injektionsstelle von einem Tier am Tag 5 nach der Injektion IL-2 Plasmid DNA nachgewiesen werden. Bei PCR-Reaktionen mit den Adenovirus-spezifischen Primern konnte Adenovirus-DNA in Proben von Tag 1 und Tag 2 nachgewiesen werden, jedoch nicht in Proben von Tag 5.

b) Um IL-2 DNA und Adenovirus dl1014 DNA aus peripheren mononukleären Blutzellen 24 und 48 h nach der Impfung

nachzuweisen, wurden zwölf DBA/2 Mäuse mit je  $1 \times 10^6$  IL-2-Plasmid-transfizierten M3 Melanomzellen immunisiert. Nach 24 und 48 h, einem Zeitraum, indem an der Injektionsstelle ein massiver Abbau der M3 Zellen stattfindet, wurden je 6 Mäuse getötet und Blut entnommen. Die PCR-Analyse zeigte, daß zu beiden Zeitpunkten weder spezifische IL-2 DNA noch Adenovirus-DNA im Blut nachweisbar ist.

c) Um IL-2 DNA und Adenovirus dl1014 DNA aus Gewebeproben von verschiedenen Organen nachzuweisen, wurden sechs DBA/2 Mäuse mit je  $1 \times 10^6$  IL-2-Plasmid-transfizierten M3 Melanomzellen immunisiert. Nach 24 und 48 h wurden je 3 Tiere getötet und Gewebeproben aus der Injektionsstelle, den ableitenden Lymphknoten, Milz, Niere, Leber, Colon und den Keimdrüsen (Ovarien) entnommen. Es konnten nur an den Injektionsstellen spezifische Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden. Alle überprüften Gewebeproben waren negativ.

d) Um auszuschließen, daß ein Transfer von rekombinanter IL-2 DNA in die Keimzellen stattfindet, wurden sechs weibliche und sechs männliche DBA/2 Mäuse mit je  $1 \times 10^6$  IL-2-Plasmid-transfizierten M3 Melanomzellen immunisiert. Nach 24 und 48 h wurden je 3 weibliche und 3 männliche Tiere getötet und die Keimzellen isoliert. Die PCR-Analyse zeigte, daß kein Transfer in die Keimzellen stattgefunden hatte.

#### Beispiel 16

- a) Testung der Wirksamkeit der Krebsvakzine auf ihre Schutzwirkung gegen Metastasenbildung ("Therapeutisches Mausmodell")

In diesem Beispiel wurde hinsichtlich der verwendeten Transfektionskomplexe, der Züchtung der Zellen und der Durchführung der Transfektionen vorgegangen, wie in Beispiel 8 beschrieben. Als Versuchstiere wurden Mäuse vom Stamm C57BL/6J verwendet, wobei jeweils 8 Tiere pro Gruppe eingesetzt wurden. Als Melanomzellen wurden die für den verwendeten Mausstamm syngenen Zellen B16-F10 (NIH DCT Tumor Depository; Fidler et al., 1975) verwendet.

Am Tag 1 wurden den Versuchstieren  $1 \times 10^5$  lebende B16-F10-Zellen intravenös injiziert, um die Ausbildung von Metastasen hervorzurufen. An den Tagen 4, 11 und 17 wurde die Krebsvakzine subkutan verabreicht, um eine Immunisierung gegen die Metastasen zu bewirken.

Pro Immunisierung wurden  $1 \times 10^5$  bestrahlte Zellen injiziert, wobei die Vakzine unterschiedliche Anteile von Zellen enthielten, die mit Zytokin-Plasmid transfiziert worden waren ("transfizierte Zellen" steht im folgenden für Zellen, die einer Transfektionsbehandlung unterzogen wurden; die Expressionswerte für die Zytokine sind jeweils pro Maus in 24 h angegeben; die Bezeichnungen entsprechen denen in Fig. 25):

- 1) Kontrollen:
  - a) Zellen, die nur bestrahlt wurden ("bestrahlt")
  - b) bestrahlte Zellen, transfiziert mit dem Leervektor pSP ("Leervektor")
- 2) Mit dem IL-2-Plasmid transfizierte Zellen:
  - a) 100 % transfizierte Zellen (Expression: 15.000 Einheiten; "IL-2 hoch")
  - b) 20 % transfizierte Zellen, 80 % nicht-transfizierte Zellen (Expression: 3.000 - 4.000 Einheiten; "IL-2 mittel")

- c) 2 % transfizierte Zellen, 98 % nicht-transfizierte Zellen (Expression: 400 Einheiten; "IL-2 niedrig")
- 3) Mit dem GM-CSF-Plasmid transfizierte Zellen:
  - a) 100 % transfizierte Zellen (Expression: 500 ng; "GM-CSF hoch")
  - b) 10 % transfizierte Zellen, 90 % nicht-transfizierte Zellen (Expression: 50 ng; "GM-CSF mittel")
  - c) 1 % transfizierte Zellen, 99 % nicht-transfizierte Zellen (Expression: 5 ng; "GM-CSF niedrig")
- 4) Mit dem IFN- $\gamma$ -Plasmid transfizierte Zellen:
  - a) 100 % transfizierte Zellen (Expression: 1.000 ng; "IFN- $\gamma$  hoch")
  - b) 10 % transfizierte Zellen, 90 % nicht-transfizierte Zellen (Expression: 100 ng; "IFN- $\gamma$  mittel")
  - c) 1 % transfizierte Zellen, 99 % nicht-transfizierte Zellen (Expression: 10 ng; "IFN- $\gamma$  niedrig")

Am Tag 28 wurde die Schutzwirkung der Krebsvakzine gegen Metastasenbildung analysiert, indem die Mäuse visuell auf das Vorhandensein von Tumoren untersucht wurden.

Die in Fig. 25 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen, daß die Krebsvakzine in Abhängigkeit des transfizierten Gens und in Abhängigkeit von der Expressionshöhe des Gens wirken.

- b) Testung der Krebsvakzine auf ihre Fähigkeit, künstlich gesetzte "Mikrometastasen" zu eliminieren

Um die tumorigene Dosis von M3-Zellen zu finden, wurde zunächst in einem Vorversuch die Zellzahl, die bei 50 % aller Tiere innerhalb von 8 Wochen und die bei 100 % aller Tiere innerhalb von 10 Wochen zu einer

lokalen Tumorentwicklung führt, mit  $1 \times 10^3$  bzw.  
 $3 \times 10^3$  M3-Melanomzellen ermittelt.

Am Tag 0 wurde allen Versuchstieren  $5 \times 10^3$  viable M3-Zellen subkutan injiziert; die M3-Zellen, die nicht metastasieren, können als "Mikrometastase" angesehen werden. Die Verabreichung der Tumorvakzine wurde bei allen Versuchstieren nach einer, zwei und nach fünf Wochen vorgenommen. Die Zytokinexpression der verabreichten Tumorvakzine betrug, jeweils pro Maus, für IL-2 bei der 1. Immunisierung 1.020 Einheiten, bei der 2. Immunisierung 1.870 Einheiten und bei der 3. Immunisierung 1.400 Einheiten. Für GM-CSF lagen die Werte pro Vakzine und Maus bei 14 ng, 9 ng und 22 ng. Die Versuchsgruppen setzten sich aus je 10 Tieren zusammen, wobei die Tiere der ersten Gruppe mit je  $1 \times 10^5$  M3-Zellen, die mit dem Vektor pWS2m transfiziert und bestrahlt waren, immunisiert wurden. Die Tiere der zweiten Gruppe wurden mit je  $1 \times 10^5$  M3-Zellen, die mit dem Vektor pWE-Gm transfiziert und bestrahlt waren, immunisiert. Die erste Kontrollgruppe wurde mit  $1 \times 10^5$  bestrahlten, jedoch nicht transfizierten, M3-Zellen behandelt. Die zweite Kontrollgruppe erhielt als Kontrolle zur Tumorentwicklung  $5 \times 10^3$  M3-Zellen. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von mehr als 4 Monaten beobachtet. Es zeigte sich, daß in den beiden Gruppen, die als Tumorvakzin ein Zytokin exprimierende Zellen erhalten hatten, 80 % der Tiere vor einer Tumorentwicklung geschützt waren. In der ersten Kontrollgruppe entwickelten alle Tiere innerhalb von 8 Wochen Tumore. In der zweiten Kontrollgruppe entwickelten alle Tiere bis auf eines Tumore.

Wirksamkeit der Tumorvakzine in Abhängigkeit von der Zytokindosis im prophylaktischen Mausmodell

In diesem Beispiel wurde hinsichtlich der verwendeten Transfektionskomplexe, der Züchtung der Zellen und der Durchführung der Transfektionen vorgegangen, wie in Beispiel 8 beschrieben. Es wurden DBA/2 Mäuse und M3 Melanomzellen verwendet. Die verwendeten Zytokin-Plasmide waren dieselben wie in Beispiel 16. Die Immunisierung wurde vorgenommen, wie in Beispiel 8 beschrieben, für das Setzen des Tumors ("Challenge") wurden im Unterschied zu Beispiel 8 statt  $1 \times 10^5$  Zellen  $3 \times 10^5$  Zellen verwendet. Die Mischungsverhältnisse von transfizierten Zellen und von Zellen, die lediglich bestrahlt waren, sowie die Expressionswerte entsprachen denen von Beispiel 16. Die Tiere wurden nach der Challenge 8 Wochen lang auf das Vorhandensein von Tumoren untersucht; das Ergebnis dieser Versuche ist in Fig. 26 dargestellt.

Beispiel 18

Verwendung von endosomolytischen Peptiden zur Herstellung von Krebsvakzinen

a) Synthese des Peptids INF5

Das Peptid der Bezeichnung INF5 (SEQ ID NO:7) wurde mittels HBTU-Aktivierungsmethode synthetisiert (Knorr et al., 1989; 1 mmol Maßstab), wobei 230 mg TentaGel S-PHB Harz (Rapp Polymere; 0.27 mmol/g) als Festphase verwendet wurde. Die erste Aminosäure, die gekoppelt wurde, war N- $\alpha$ -N- $\epsilon$ -di-Fmoc-Lysin. Das ergab ein Kopf-an-Kopf-Dimeres, mit einem C-terminalen Lysin als verbindende Aminosäure.

(Es wurden die folgenden Seitenkettenenschutzgruppen verwendet: (Trt)Asn, (Trt)Cys oder (t-Bu)Cys, (t-Bu)Glu, (Trt)His, (t-Bu)Ser. Die Peptide wurden vom Harz gespalten und die Seitenschutzgruppen außer (t-Bu)Cys durch Behandlung von 10 - 20 mg Peptidbeladenem Harz mit 1 ml einer Mischung Trifloressigsäure/Wasser/Phenol/Thioanisol/ Ethanedithiol (10:0.5:0.75:0.5:0.25) 1.5 h bei Raumtemperatur entfernt.) Für die Fällung des Peptids wurde die Spaltmischung unter Rühren tropfenweise in 40 ml Ether pipettiert und die Mischung 1 h stehengelassen. Das rohe Peptid wurde mittels Zentrifugation erhalten, anschließend wurde mit Ether gewaschen und unter Argon und abschließend im Hochvakuum getrocknet.

b) Gentransfer in humane Melanomzellen mittels INF5

i) Expression des Luciferase-Reportergens

Zunächst wurden Vorversuche mit dem Reportergenkonstrukt pCMVL durchgeführt, wobei 1.5 µg Tfpl290, 5 µg pL290, 40 µg INF5 und 3 µg pCMVL zur Herstellung von Transfektionskomplexen verwendet wurden. In diesen Komplexen war das Peptid ionisch an Polylysin gebunden. Die DNA-Komplexe wurden mit 0.5 ml RPMI 1640 (Gibco), enthaltend 10 % FCS, gemischt und auf M3-Melanomzellen aufgebracht ( $1 \times 10^5$  Zellen in 6-Well-Platten). Nach 4 h wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und auf Luciferaseaktivität untersucht. Es wurde eine Expression entsprechend 12,866.000 Lichteinheiten nachgewiesen.

ii) Expression von humanem IL-2

Transfektionskomplexe, bestehend aus 3 µg pGShIL-2tet, 1.5 µg Tfpl290, 5 µg pL290 und 40 µg INF5, wurden, wie in

i) beschrieben, auf Melanomzellen aufgebracht. Einen und zwei Tage nach der Transfektion wurden die innerhalb von 24 h ins Kulturmedium sekretierten Mengen an IL-2 mittels ELISA-Assay (Biokine IL-2 Testkit, T Cell Diagnostics) gemessen. Die Werte betrugen am ersten Tag 6.500 BRMP-Einheiten, am zweiten Tag 11.500 BRMP-Einheiten, wobei eine Einheit 40 pg IL-2 entspricht.

c) Testung von mittels INF5 transfizierten Tumorzellen als Tumorvakzine im prophylaktischen Melanom-Mausmodell

In diesem Versuch wurden Mäuse des Stammes C57BL/6J sowie B16-F10-Zellen verwendet. Es wurden zwei Immunisierungen mit je  $1 \times 10^5$  Zellen im Abstand von 7 Tagen durchgeführt; 7 Tage nach der letzten Immunisierung wurde die Challenge ( $1 \times 10^5$  Zellen) gesetzt. Die Krebsvakzine wurden unter Verwendung eines Transfektionskomplexes, bestehend aus 6 µg pWS-Gm-DNA, 3 µg Tfpl, 10 µg pL und 40 µg INF5 hergestellt. Es wurden Tumorvakzine eingesetzt, die unterschiedliche Mengen von GM-CSF-Plasmid tragenden Zellen enthielten, wobei die Mischungsverhältnisse von bestrahlten, transfizierten Zellen und von Zellen, die lediglich bestrahlt waren, dieselben waren, wie in Beispiel 16 beschrieben. Das Ergebnis mit Tumorvakzinen, die mittels INF-5 transfizierte Zellen enthielten, ist in Fig. 27 dargestellt. Es zeigte sich eine Schutzwirkung gegen Tumorbildung bei der hohen und mittleren GM-CSF-Dosierung.

Beispiel 19

Interleukin-Expression in humanen Melanomzellen

$3 \times 10^5$  Melanomzellen wurden eine Woche nach ihrer operativen Entnahme in 6 cm Zellkulturschalen mit 2 ml Transfektionskomplex (0.5 ml Ausgangslösung, enthaltend biotinyliertes 8-Methoxypsoralen/UV-inaktiviertes Adenovirus ( $0.54 \times 10^{12}$  Partikel/ml), 100 ng/ $\mu$ l Streptavidin-Polylysin, 6  $\mu$ g Plasmid-DNA pGShIL-2tet, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l Tf<sub>p</sub>L, in HBS, verdünnt mit 1.5 ml Medium) transfiziert. Die Versuche wurden mit bestrahlten (100 Gy) und nicht-bestrahlten Zellen durchgeführt. Die IL-2-Werte wurden nach den in Fig. 28 angegebenen Zeiten gemessen; die IL-2-Werte beziehen sich auf  $10^6$  Zellen und 24 h.

#### Beispiel 20

#### Entwicklung einer galenischen Formulierung für die Krebsvakzine

Ausgangsmaterial waren mit dem Plasmid pGShIL-2tet transfizierte und mit 100 Gy bestrahlte MM3-Melanomzellen; nach einer Inkubation von 20 h bei 37°C wurden die Zellen trypsinisiert und Zellzahl sowie Viabilität mit Trypanblau bestimmt. Dann wurden die Zellen auf vier gleiche Gruppen aufgeteilt, um vier verschiedene Gefriermedien zu testen. Die vier Probengruppen wurden vor dem Versetzen mit Gefriermedium in RPMI 1640 bei 800 rpm (120 g) zentrifugiert, die Zellpellets in 1 ml Gefriermedium gegeben. Nachdem Aliquots für Bestimmung der Zellzahl und Viabilität entnommen worden waren, wurden die Proben sofort in das Gefriergerät gegeben und schonend unter Verwendung eines Temperaturgradientenprogramms (-1°C/min) auf -100°C eingefroren und in flüssigen Stickstoff transferiert. Als Gefriermedien wurden getestet: Medium 1: 70 % RPMI, 20 % FCS, 10 % DMSO; Medium 2: 20 % Humanserumalbumin,

10 % DMSO; Medium 3: 12 % HES (Hydroxyethylstärke), Ringerlösung (Leopold Pharma, Nr. 2870), 5 % DMSO; Medium 4: 12 % HES in Ringerlösung.

Nach 38 Tagen wurden die Zellen aufgetaut und unmittelbar danach Zellzahl und Viabilität der Zellen mittels Trypanblau bestimmt. Dann wurden die Proben in einem ersten Waschschritt mit dem entsprechenden Medium (Gefriermedium ohne DMSO) sowie in einem zweiten und dritten Waschschritt mit Ringerlösung gewaschen, zentrifugiert und in Ringerlösung resuspendiert. Dann wurden abermals Zellzahl und Viabilität der Zellen bestimmt. Des weiteren wurden Zellzahl und Viabilität nach 24 und nach 48 h bei 4°C bestimmt. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tabelle V dargestellt.

Von jeder Probengruppe (Medium 1 - 4) wurden außerdem je 300 µl mit 3 ml Komplettmedium in T25-Kulturflaschen gegeben und bei 37°C inkubiert; nach 24 und 48 h wurde Überstand für die Bestimmung der IL-2-Expression (Probengruppe Medium 1) und die Bestimmung des Anteils der Zellen im Überstand entnommen. Von den weiteren Proben, die zunächst in Ringerlösung bei 4°C stehengelassen worden waren, wurde nach 24 und 48 h ebenfalls jeweils ein Aliquot von 300 µl entnommen und, wie oben beschrieben, bei 37°C bebrütet (IL-2-Bestimmung für Probengruppe Medium 1). Das Ergebnis dieser Versuche ("4° Galenik") ist in Tabelle VI dargestellt.

#### Beispiel 21

Einfluß des Endotoxingehaltes der DNA auf die Expression von IL-2 in primären humanen Melanomzellen

In diesem Beispiel wurden die folgenden Materialien und Methoden verwendet:

a) DNA-Präparation

Das Plasmid pGShIL-2tet wurde aus E.coli-Übernachtkulturen (gezüchtet in Gegenwart von 5 µg/ml Tetracyclin in LB-Medium) erhalten.

b) Reinigung der Plasmid-DNA von Endotoxin  
(Lipopolysaccharid)

i) Triton X-114-Extraktion

Um ein homogenes Präparat des Detergens zu erhalten, wurde Triton X-114 (Sigma) drei 0°C/30°C-Temperaturzyklen, wie von Bordier, 1981, beschrieben, unterworfen. Die Extraktion der Lipopolysaccharide von der DNA-Probe wurde, in Abwandlung publizierter Methoden (Aida und Pabst, 1990; Manthorpe et al., 1993) wie folgt durchgeführt: Die DNA-Probe (0.5 - 1.5 mg/ml in 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4 (TE)) wurde auf 0.3 M Natriumacetat (pH 7.5) gebracht. Dann wurde 3 µl Triton X-114 pro 100 µl DNA-Lösung beigegeben, die Proben in einem Vortex kräftig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Damit sich die beiden Phasen trennen können, wurden die Proben 5 min bei 30°C aufbewahrt, in einer vorgewärmten Eppendorf-Zentrifuge 2 min bei 2.000 rpm zentrifugiert und die wässrige Phase in ein frisches Eppendorf-Röhrchen gegeben. Diese Extraktion wurde noch zweimal durchgeführt und die schließlich erhaltene wässrige Phase mit 0.6 Volumina Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, das Präzipitat mittels Zentrifugation gewonnen, zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in TE wieder aufgenommen und die Menge bestimmt. Dazu wurde die Probe mit RNase A,

Proteinase K, Phenol/Chloroform und Chloroform behandelt, wieder gefällt und das endgültige DNA-Pellet in TE suspendiert und die Absorption bei 260 nm bestimmt, wobei von der Annahme ausgegangen wurde, daß eine Konzentration von 0.05 mg/ml DNA den Absorptionswert 1 hat.

ii) Polymyxin-Chromatographie

Ein Volumen Polymyxinharzschlamm (Affi-Prep-Polymyxin, Biorad), das dem Volumen der DNA-Probe entsprach, wurde kurz mit drei Volumina 0.1 N NaOH versetzt, anschließend wurde dreimal mit fünf Harzvolumina TE gewaschen. Das pelletierte Harz wurde mit den DNA-Proben (in TE 0.8 - 1.2 mg/ml) wieder aufgenommen und die Mischung über Nacht bei 4°C gerührt. Dann wurde die Probe auf eine mit 0.1 NaOH vorbehandelte Wegwerfsäule gegeben und mit TE gewaschen. Das Eluat wurde gesammelt, das Harz mit einem weiteren Volumen TE gewaschen und das Eluat mit der Waschflüssigkeit vereinigt. Die DNA dieser gepoolten Probe wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5 und 2 Volumen Ethanol gefällt. Die Weiterbehandlung des Präzipitats und die DNA-Bestimmung wurden durchgeführt, wie oben beschrieben.

c) Zellkultur

Primäre humane Melanomzellen wurden isoliert und in RPMI 1640-Medium (Gibco/BRL), ergänzt mit 100 I.U./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 % Natriumpyruvat und 10 % hitzeinaktiviertem FCS, kultiviert.

d) Endotoxin-Assay

Der Lipopolysaccharidgehalt wurde mit dem chromogenen Limulus-Assay, der auf der Limulus-Gerinnungsreaktion von

Amöbozyten beruht (Iwanaga, 1993; erhältlich bei BioWhittaker QCL-1000), durchgeführt. Vor der Versuchsdurchführung wurden alle verwendeten biologischen Materialien und Reagenzien auf Lipopolysaccharid-Freiheit (<0.1 Endotoxineinheiten (EU)/50 µl Lösung) getestet.

e) Herstellung von Transfektionkomplexen

Ternäre Komplexe aus Transferrin-Polylysin, Streptavidin-Polylysin und biotinyliertem, 8-Methoxypsoralen/UV-inaktiviertem Adenovirus d11014 (8 µl,  $1 \times 10^{12}$  Partikel/ml), sowie Plasmid-DNA (6 µg, verdünnt in 100 µl mit dem jeweils angegebenen Lipopolysaccharidgehalt) wurden hergestellt, wie in den vorangegangenen Beispielen beschrieben.

Primäre humane Melanomzellen der Bezeichnung H225 ( $2 \times 10^5$  Zellen/6 cm Kulturschale) wurden mit 6 µg des nach verschiedenen Methoden gereinigten Plasmids, entsprechend den Angaben in Fig. 29, transfiziert. Der Endotoxingehalt der Plasmidpräparation vor der Reinigung ist in der Fig. jeweils als dunkel schraffierter Balken dargestellt. Nach der Reinigung mittels Polymyxinharz oder Extraktion mit Triton X-114 enthielten alle Präparate weniger als 0.1 EU Lipopolysaccharid/6 µg DNA. Der IL-2-Gehalt wurde mittels ELISA (T Cell Diagnostics Inc., Cambridge, MA USA) im Zellüberstand gemessen, die in der Fig. angegebenen Werte bedeuten Einheiten/ $10^6$  Zellen und 24 h.

Im Rahmen dieses Beispiels wurden außerdem Versuche durchgeführt, die zeigten, daß der durch Zusatz von LPS zu gereinigter DNA bedingte Expressionsabfall zumindest teilweise aufgehoben werden kann, wenn dem Medium Polymyxin beigefügt wurde.

### Beispiel 22

Induktion einer systemischen Immunantwort durch Immunisierung mit zytokintransfizierten, bestrahlten Colonkarzinomzellen ("Prophylaktisches Colonkarzinommodell")

In diesem Beispiel wurde hinsichtlich der verwendeten Transfektionskomplexe, der Züchtung der Zellen der Durchführung der Transfektionen vorgegangen, wie in Beispiel 8 beschrieben, wobei hinsichtlich der eingesetzten Zytokin-DNA und deren Dosierung sowie der Kontrollen (Leervektor, nur bestrahlte Zellen) dem Protokoll von Beispiel 16 gefolgt wurde; die in Fig. 30 verwendeten Bezeichnungen entsprechen denen von Beispiel 16 und Fig. 25. Es wurden Zellen einer Colonkarzinomzelllinie der Bezeichnung CT 26 verwendet, deren Etablierung von Brattain et al., 1988, beschrieben wurde. Als Versuchstiere dienten Mäuse vom Stamm BALB/c. Für die beiden Immunisierungen wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen verwendet, die Challenge wurde mit  $3 \times 10^5$  Zellen gesetzt. In Tabelle VII sind die Expressionswerte in 24 h für IL-2 (Einheiten/Maus), IFN-gamma und GM-CSF (jeweils ng/Maus) angegeben, sekretiert zwischen Bestrahlung der Zellen und Injektion (1. Immunisierung/2. Immunisierung). Fig. 30 zeigt die Schutzwirkung der Colonkarzinom-Tumorvakzine vor Tumorbildung.

Tabelle I

## Plasmidverhältnis

## Genexpression

ng IFN- $\gamma$  Einheiten IL-2  
(pro 10<sup>6</sup> Zellen/24 h)

IFN- $\gamma$ 100 %/IL-2 0 %	369.6	-
IFN- $\gamma$ 75 %/IL-2 25 %	290.4	7920
IFN- $\gamma$ 50 %/IL-2 50 %	204.6	11880
IFN- $\gamma$ 25 %/IL-2 75 %	83.8	14520
IFN- $\gamma$ 10 %/IL-2 90 %	42.9	18150

Luciferase Lichteinheiten/ $\mu$ g Protein

pCMVL 100 %/pSP 0 %	1531438
pCMVL 75 %/pSP 25 %	1191660
pCMVL 50 %/pSP 50 %	700052
pCMVL 25 %/pSP 75 %	209914
pCMVL 12.5 %/pSP 87.5 %	48352
pCMVL 6.3 %/pSP 93.7 %	14632
pCMVL 3.1 %/pSP 96.9 %	7324

### M-3 Melanom Entwicklung in DBA/2 Mäusen

		Wochen nach Tumorzellimplantation									
		1 w	2 w	3 w	4 w	5 w	6 w	7 w	8 w	9 w	10 w
Keine Immunisierung		2 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4
Nicht transfizierte M-3		0 / 6	2 / 6	4 / 6	4 / 6	3 / 6	3 / 6	4 / 6	4 / 6	4 / 6	5 / 6
pSP 100% (d11014)		0 / 6	3 / 6	3 / 6	3 / 6	3 / 6	3 / 6	3 / 6	4 / 6	4 / 6	4 / 6
IL-2 100% (d11014)		0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5

Tabelle II

### M-3 Melanom Entwicklung in DBA/2 Mäusen

Immunisierungen (2x) ( $1 \times 10^5$ Zellen, bestrahlt)	Wochen nach Tumorzellimplantation					
	1 w	2 w	3 w	4 w	5 w	6 w
Keine Immunisierung	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
IL-2 100% (d11014)	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
IL-2 10% (d11014)	0 / 5	2 / 5	2 / 5	2 / 5	2 / 5	2 / 5
IL-2 90%+IFN- $\gamma$ 10% (d11014)	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
IFN- $\gamma$ 10% (d11014)	4 / 6	5 / 6	5 / 6	5 / 6	5 / 6	5 / 6
IL-2 100% (d1312)	1 / 5	1 / 5	1 / 5	1 / 5	1 / 5	2 / 5

Tabelle III

Tabelle IV

## Tumorentwicklung in DBA/2 Mäusen

Immunisierungen (2 x) (1 x 10 <sup>5</sup> M-3 Zellen)	Wochen nach Tumorzellimplantation			
	1 w	2 w	3 w	4 w
1 x 10 <sup>5</sup> M-3				
Keine Immunisierung	0/6	2/6	6/6	6/6
pSP (dl1014)	0/6	1/6	3/6	4/6
IL-2 100 % (dl1014)	0/6	0/6	0/6	0/6
IL-2 4 % (dl1014)	0/5	0/5	1/5	1/5
3 x 10 <sup>5</sup> M-3				
IL-2 100 % (dl1014)	0/5	0/5	0/5	2/5
IL-2 4 % (dl1014)	0/5	2/5	3/5	4/5
1 x 10 <sup>6</sup> M-3				
IL-2 100 % (dl1014)	0/4	0/4	1/4	1/3
IL-2 4 % (dl1014)	1/5	3/5	4/5	4/5
1 x 10 <sup>5</sup> KLN 205				
IL-2 100 % (dl1014)	0/6	2/6	6/6	6/6

Tabelle V

## GEFRIERGALENIK

Zellen: MM3 transplantiert mit human IL-2 ; bestrahit mit 100 Gray, N<sub>2</sub>-eingefroren, 38 Tage später aufgetaut

Zeitpunkt	unmittelbar vor dem Eintrieren	unmittelbar nach dem Auftauen	Galerik (Ringers) 0 h	24 h bei 4°C	48 h bei 4°C	
Gefriermedium	Zellzahl ( $\times 10^6$ )	Viability (%)	Zellzahl ( $\times 10^6$ )	Viability (%)	Zellzahl ( $\times 10^6$ )	Viability (%)
70% RPMI + 20% FCS + 10% DMSO	3,1	99%	2,8	98%	1,6	80%
20% HSA + 10% DMSO	3,0	100%	2,9	98%	0,8	62%
12% HES, Ringers + 5% DMSO	2,9	98%	2,0	86%	0,8	50%
12% HES in Ringers	2,8	94%	0,4	40%	0,3	47%

Tabelle VI

MM3 Zellen, 4°C Gallenik ausgesät zum Zeitpunkt:	0 h bei 4°C		24 h bei 4°C		48 h bei 4°C	
	Gefriermedium	Aussehen (% Zellen im Überstand)	IL-2 Expression Units/ 24h/ 1x10 <sup>6</sup> Zellen	Aussehen (% Zellen im Überstand)	IL-2 Expression Units/ 24h/ 1x10 <sup>6</sup> Zellen	Aussehen (% Zellen im Überstand)
70% RPMI + 20% FCS + 10% DMSO	24 h: 10% 48 h: 10%	24 h: 11 195 48 h: 7069	24 h: 50% 48 h: 50%	24 h: 4646 48 h: 4862	24 h: 50% 48 h: 60%	24 h: 5940 48 h: 3794
20% HSA + 10% DMSO	24 h: 70% 48 h: 80%		24 h: 95% 48 h: 95%		24 h: 100% 48 h: 100%	
12% HES in Ringers + 5% DMSO	24 h: 20% 48 h: 20%		24 h: 60% 48 h: 60%		24 h: 70% 48 h: 70%	
12% HES in Ringers	24 h: 40% 48 h: 40%					

## Tabelle VII

Vakzine	Expression 1.Immun./2.Immun.
GM-CSF (hoch)	241/184
GM-CSF (mittel)	24/18
GM-CSF (niedrig)	2.4/1.8
IL-2 (hoch)	4302/4624
IL-2 (mittel)	860/925
IL-2 (niedrig)	86/93
IFN-γ (hoch)	129/63
IFN-γ (mittel)	13/6
IFN-γ (niedrig)	1.3/0.6

## Literatur

- Abrahamson, D.R. et al., 1981, J. Cell. Biol. 91, 270-280.
- Aida, Y. und Pabst, M.J., 1990, J. Immunol. Methods 132, 191-195.
- Anderson, P. et al., 1982, J. Biol. Chem. 257, 11301-11304.
- Anilionis, A., Wunner, W.H., Curtis, P.J., 1982, Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 5, 27-32.
- Asada-Kubota, M. et al., 1983, Exp. Pathol. 23, 95-101.
- Ascoli, M. et al., 1978, J. Biol. Chem. 253, 7832-7838.
- Ashwell, G. et al., 1982, Annu. Rev. Biochem. 51, 531-554.
- Baskar, S., Ostrand-Rosenberg, S., Nabavi, N., Nadler, L., Freeman, G. und Glimcher, L., 1993, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90, 5687-5690.
- Berd, D., Maguire, H.C., McCue, P. und Mastrangelo, M.J., 1990, J. Clin. Oncol. 8, 1858-1867.
- Bordier, C., 1981, J. Biol. Chem. 256, 1604-1607.
- Boshart, M. et al., 1985, Cell 41, 521-530.
- Brattain, M.G., Strobel-Stevens, J., Fine, E., Webb M. und Sarrif, A.M., 1980, Cancer Res. 40, 2142-2145.
- Bridge, E. und Ketner, G., 1989, J. Virol. 63, 631-638.
- Budowsky, E. und Zalesskaya, M., 1991, Vaccine 9, 319.
- Bystryn, J.C., 1990, Cancer Metastasis Rev. 9, 81091.
- Bystryn, J.C., Oratz, R., Roses, D., Harris, M., Henn, M. und Lew, R., 1992, Cancer 69, 1157-1164.
- Carpenter, G., 1984, Cell 37, 357-358.
- Chardonnet, Y. und Dales, S., 1970, Virology 40, 462-477.
- Chen, L., Ashe, S., Brady, W.A., Hellström, I., Hellstrom, K.E., Ledbetter, J.A., McGowan, P. und Linsley, P.S., 1992, Cell 71, 1093-1102.
- Cheng, S-Y. et al., 1980, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 3425-3429.

- Cotten, M., Laengle-Rouault, F., Kirlappos, H., Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., Beug, H. und Birnstiel., M.L., 1990, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87, 4033-4037.
- Cotten, M., Wagner, E., Zatloukal, K., Phillips, S., Curiel, D.T. und Birnstiel, M.L., 1992, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89, 6094-6098.
- Curiel, D.T., Agarwal, S., Wagner, E. und Cotten, M., 1991, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88, 8850-8854.
- Curiel, D.T., Agarwal, S., Romer, M.U., Wagner, E., Cotten, M., Birnstiel, M.L. und Boucher, R.C., 1992a, Am.J.Respir.Cell and Mol.Biol. 6, 247-252.
- Curiel, D.T., Wagner, E., Cotten, M., Birnstiel, M.L., Agarwal, S., Li, Ch.-M., Loechel, S. und Hu, P.-H., 1992b, Human Gene Therapie 3, 147-154.
- Davidson, D. und Hassell, J.A., 1987, J. Virol. 61, 1226-1239.
- De Shu, J., Pye, D., und Cox, J., 1986, J. Biol. Stand. 14, 103.
- De Wet, J., Wood, K., DeLuca, M., Helsinki, D. und Subramani, S., 1987, Mol. Cell. Biol. 7, 725-737.
- Fakhrai, H., Gjerset, R., Shawler, D.L., Naviaux, R., Royston, I. und Sobol, R., 1992, J. Cell. Biochem. Suppl. 16F, 47.
- Fearon, E.R., Itaya, T., Hunt, B., Vogelstein, B. und Frost, P., 1988, Cancer Res. 48, 2975-2980.
- Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Columbek, P., Levitzky, H.I., Simons, J.W., Karasuyama, H., Vogelstein, B. und Frost, P., 1990, Cell 60, 397-403.
- Feinberg, A. und Vogelstein, B., 1984, Anal. Bioche 137, 266-267.
- Fidler et al., 1975, Cancer Res. 35, 218-234.
- Freshney, R.I., 1987, Disaggregation of the Tissue and Primary Culture, Culture of Animal Cells.
- Goldstein, J.L. et al., 1979, Proc.Natl Acad.Sci. USA 76, 333-337.
- Goldstein, L.J. et al., 1980, Nature 285, 66.

- Goldstein, J.L. et al., 1982, Clin. Res., 30, 417-426.
- Gooding, L.R., 1992, Cell 71, 5-7.
- Gray, P.W. und Goeddel, D.V., 1983, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80, 5842-5846.
- Gunning, P., Leavitt, J., Muscat, G., Ng, S.-Y. und Kedes, L., 1987, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84, 4831-4835.
- Hanson, C.V., 1992, Blood Cells 18, 7-25.
- Heldin, C-H. et al., 1982, J. Biol. Chem. 257, 4216-4221.
- Hizuka, N. et al., 1981, J. Biol. Chem. 256, 4591-4597.
- Hoon, D.S.B, Foshag, L.J., Nizze, A.S., Bohman, R. und Morton, D.L., 1990, Cancer Res. 50, 5358-5364.
- Hosang, M. et al., 1987, EMBO J. 6, 1197-1202.
- Imamura, K. et al., 1987, J. Immunol. 139, 2989-2992.
- Itaya, T., Yamagiwa, S., Okada, F., Oikawa, T., Kuzumaki, N., Takeichi, N., Hosokawa, M. und Kobayashi, H., 1987, Cancer Research 47, 3136-3140.
- Iwanaga, S., 1993, Curr. Opin. Immunol. 5, 74-82.
- Jenkins, M.K. und Johnson, J.G., 1993, Current Opinion in Immunol. 5, 361-367.
- Jones, G.E., 1989, Establishment, Maintenance and Cloning of Human Primary Cell Strains, Methods in Molecular Biology, Vol. 5.
- Jones, N. und Shenk, T., 1979, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 3665-3669.
- Kaplan, J. et al., 1979, J. Biol. Chem. 254, 7323-7328.
- Karasuyama, H. und Melchers, F., 1988, Eur. J. Immunol. 18, 97-104.
- Karasuyama, H., Tohyama, N. und Tada, T., 1989, J. Exp. Med. 169, 13.
- Kay, R., Takei, F. und Humphries, R.K., 1990, J. Immunology 145, 1952-1959.
- Klausner, R.D. et al., 1983, J. Biol. Chem. 258, 4715-4724.
- Klausner, R.D. et al., 1983, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80, 2263-2266.

- Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W. und Gillessen, D., 1989, Tetrahedron Letters 30, 1927-1930.
- Kuhn, L.C. et al., 1982, Trends Biochem. Sci. 7, 299-302.
- Lim, K. und Chae, C.B., 1989, BioTechniques 7, 576-579.
- Liu, Y., Jones, B., Brady, W., Janeway, C.A. und Linsley, P.S., 1992a, Eur. J. Immunol. 22, 2855-2859.
- Liu, Y., Jones, B., Aruffo, A., Sullivan, K.M., Linsley, P.S. und Janeway, C.A., 1992b, J. Exp. Med. 175, 437-445.
- Lotze, M.T., Zeh, H.J., Elder, E.M., Cai, Q., Pippin, B.A., Rosenstein, M.M., Whiteside, T.L. und Herberman, R., 1992, J. Immunotherapy 12, 212-217.
- Manthorpe, M., Cornefert-Jensen, F., Hartikka, J., Felgner, J., Rundell, A., Margalith, M. und Dwarki, V., 1993, Human Gene Therapy 4, 419-431.
- Marshall, S., 1985, J Biol. Chem. 250, 4133-4144.
- Massague, J. et al., 1986, J. Cell. Physiol. 128, 216-222.
- Mellman, I.S. et al., 1984, J. Cell. Biol. 98, 1170-1177.
- Miyatake, S., Otsuka, T., Yokota, T., Lee, F. und Arai, K., 1985, EMBO J. 4, 2561-2568.
- Mizel, S.B. et al., 1987, J. Immunol. 138, 2906-2912.
- Morgeaux, S., Tordo, N., Gontier, C. und Perrin, P., 1993, Vaccine 11, 82-90.
- Nakamura, T. et al., 1989, Nature 342, 440-443.
- Nevins, J.R., 1991, TIBS 16, 435-439.
- Nevins, J.R., 1992, Science 258, 424-429.
- Ostrand-Rosenberg, S., Thakur, A. und Clements, V., 1990, J. Immunol. 144, 4068-4071.
- Paeratakul, U., De Stasio, P. und Taylor, M., 1988, J. Virol. 62, 1132-1135.
- Pardoll, D., 1992, Curr. Opin. Immunol. 4, 619-623.
- Plaksin, D., Gelber, C., Feldman, M. und Eisenbach, L., 1988, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85, 4463-4467.
- Posner, B.I. et al., 1982, J. Cell. Biol. 93, 560-567.

- Precious, B. und Russell, W.C., 1985, *Virology*, ed. Mahy, B.W.J., IRL Press, Oxford, Washington, DC, 193-205.
- Rosenberg, S.A. et al., 1992, *Human Gene Therapy* 3, 75-90.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (2.Auflage).
- Schalch, D.S. et al., 1986, *Endocrinology* 118, 1590-1597.
- Schirrmacher, V., 1990, *Spektrum der Wissenschaft*, Januar 90, 38-50.
- Schwartz, R.H., 1992, *Cell* 71, 1065-1068.
- Seed, B., 1987, *Nature* 329, 840-842.
- Severne, Y., Wieland, S., Schaffner, W. und Rusconi, S., 1988, *EMBO J.* 7, 2503-2508.
- Sharon, N., 1987, *Cell Separation: Methods and Selected Applications*, Vol. 5, Academic Press Inc., pp.13-44.
- Sly, W.S. und Grubb, J., 1979, *Isolation of Fibroblasts from Patients, Methods in Enzymology*, Vol. LVIII.
- Sly, W. et al., 1982, *J. Cell. Biochem.* 18, 67-85.
- Smith, K.A. et al., 1985, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82, 864-867.
- Soberon, X., Covarrubias, L. und Boliviari, F., 1980, *Gene* 9, 287.
- Springer, T.A., Dustin, M.L., Kishimoto, T.K. und Marlin, S.D., 1987, *Annu. Rev. Immunol.* 5, 223.
- Stahl, P.D. et al., 1978, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75, 1399-1403.
- Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. und Hamuro, J., 1983, *Nature* 302, 305-310.
- Townsend, S.E. und Allison, J.P., 1993, *Science* 259, 368-370.
- Uchida, Y., Tsukada, U. und Sugimori, T., 1977, *J. Biochem.* 82, 1425-1433.
- Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H. und Birnstiel, M.L., 1990, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87, 3410-3414.

- Wagner, E., Cotten, M., Poisner, R. und Birnstiel, M.L., 1991a, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88, 4255-4259.
- Wagner, E., Cotten, M., Mechtler, K., Kirlappos, H. und Birnstiel, M.L., 1991b, Bioconjugate Chem. 2, 226-231.
- Wagner, E., Zatloukal, K., Cotten, M., Kirlappos, H., Mechtler, K., Curiel, D.T. und Birnstiel, M.L., 1992, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89, 6099-6103.
- Walker, F. et al., 1987, J. Cell. Physiol. 130, 255-261.
- Weinberg, D.H. und Ketner, G., 1983, Proc.Natl.Acad. Sci. USA 80, 5383-5386.
- Zatloukal, K., Wagner, E., Cotten, M., Phillips, S., Plank, C., Steinlein, P., Curiel, D. und Birnstiel, M.L., 1992, Ann.New York Acad.Sci. 660, 136-153.
- Zenke, M., Steinlein, P., Wagner, E., Cotten, M., Beug, H. und Birnstiel, M.L., 1990, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87, 3655-3659.
- Trends Pharmacol. Sci. 10, 1989, 458-462.
- Human Cancer in Primary Culture, 1991, Hsg. John R.W. Masters, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London.

SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Ingelheim International GmbH
- (B) STRASSE: Binger Strasse 173
- (C) ORT: Ingelheim am Rhein
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-55216
- (G) TELEPHON: 06132/772822
- (H) TELEFAX: 06132/774377
- (I) TELEX: 4187910 bi d

(ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Herstellung von Krebsvakzinen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1664 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Rabies virus

## (ix) MERkmale:

- (A) NAME/Schlüssel: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..6

## (ix) MERkmale:

- (A) NAME/Schlüssel: CDS
- (B) LAGE: 7..1581

## (ix) MERkmale:

- (A) NAME/Schlüssel: sig\_peptide
- (B) LAGE: 7..63

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide  
 (B) LAGE: 64..1578

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

TCTAAAT ATG GTT CCT CAG GCT CTC CTG TTT GTA CCC CTT CTG GTT TTT Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe -19              -15                          -10	48
CCA TTG TGT TTT GGG AAA TTC CCT ATT TAC ACG ATC CCA GAC AAG CTT Pro Leu Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Tyr Thr Ile Pro Asp Lys Leu -5                    1                      5                          10	96
GGT COC TGG AGC CGG ATT GAC ATA CAT CAC CTC AGC TGC CCA AAC AAT Gly Pro Trp Ser Pro Ile Asp Ile His His Leu Ser Cys Pro Asn Asn 15                    20                      25	144
TTG GTA GTG GAG GAC GAA GGA TGC ACG AAC CTG TCA CGG TTC TCC TAC Leu Val Val Glu Asp Glu Gly Cys Thr Asn Leu Ser Gly Phe Ser Tyr 30                    35                      40	192
ATG GAA CTT AAA GTT GGA TAC ATC TTA GCC ATA AAA ATG AAC GGG TTC Met Glu Leu Lys Val Gly Tyr Ile Leu Ala Ile Lys Met Asn Gly Phe 45                    50                      55	240
ACT TGC ACA GCC GTT GTG ACG GAG GCT GAA ACC TAC ACT AAC TTC GTT Thr Cys Thr Gly Val Val Thr Glu Ala Glu Thr Tyr Thr Asn Phe Val 60                    65                      70                      75	288
GGT TAT GTC ACA ACC ACG TTC AAA AGA AAG CAT TTC CGC CCA ACA OCA Gly Tyr Val Thr Thr Phe Lys Arg Lys His Phe Arg Pro Thr Pro 80                    85                      90	336
GAT GCA TGT AGA GCC GCG TAC AAC TGG AAG ATG GCC GGT GAC CCC AGA Asp Ala Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Trp Lys Met Ala Gly Asp Pro Arg 95                    100                      105	384
TAT GAA GAG TCT CTA CAC AAT CGG TAC OCT GAC TAC CGC TGG CTT CGA Tyr Glu Glu Ser Leu His Asn Pro Tyr Pro Asp Tyr Arg Trp Leu Arg 110                    115                      120	432
ACT GTA AAA ACC ACC AAG GAG TCT CTC GTT ATC ATA TCT CCA AGT GTA Thr Val Lys Thr Lys Glu Ser Leu Val Ile Ile Ser Pro Ser Val 125                    130                      135	480
GCA GAT TTG GAC CCA TAT GAC AGA TCC CTT CAC CGG AGG GTC TTC CCT Ala Asp Leu Asp Pro Tyr Asp Arg Ser Leu His Ser Arg Val Phe Pro 140                    145                      150                      155	528
AGC GGG AAG TGC TCA GGA GTA CGG GTG TCT TCT ACC TAC TGC TCC ACT Ser Gly Lys Cys Ser Gly Val Ala Val Ser Thr Tyr Cys Ser Thr 160                    165                      170	576

AAC CAC GAT TAC ACC ATT TGG ATG CCC GAG AAT CCG AGA CTA GGG ATG Asn His Asp Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg Leu Gly Met 175 180 185	624
TCT TGT GAC ATT TTT ACC AAT AGT AGA GGG AAG AGA GCA TCC AAA GGG Ser Cys Asp Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala Ser Lys Gly 190 195 200	672
AGT GAG ACT TGC GGC TTT GTA GAT GAA AGA GGC CTA TAT AAG TCT TTA Ser Glu Thr Cys Gly Phe Val Asp Glu Arg Gly Leu Tyr Lys Ser Leu 205 210 215	720
AAA GGA GCA TCC AAA CTC AAG TTA TGT GGA GTT CTA GGA CTT AGA CTT Lys Gly Ala Cys Lys Leu Lys Leu Cys Gly Val Leu Gly Leu Arg Leu 220 225 230 235	768
ATG GAT GGA ACA TGG GTC GCG ATG CAA ACA TCA AAT GAA ACC AAA TGG Met Asp Gly Thr Trp Val Ala Met Gln Thr Ser Asn Glu Thr Lys Trp 240 245 250	816
TGC CCT CCC GAT CAG TTG GTG AAC CTG CAC GAC TTT CGC TCA GAC GAA Cys Pro Pro Asp Gln Leu Val Asn Leu His Asp Phe Arg Ser Asp Glu 255 260 265	864
ATT GAG CAC CTT GTT GTA GAG GAG TTG GTC AGG AAG AGA GAG GAG TGT Ile Glu His Leu Val Val Glu Glu Leu Val Arg Lys Arg Glu Glu Cys 270 275 280	912
CTG GAT GCA CTA GAG TCC ATC ATG ACA ACC AAG TCA GTG AGT TTC AGA Leu Asp Ala Leu Glu Ser Ile Met Thr Thr Lys Ser Val Ser Phe Arg 285 290 295	960
CGT CTC AGT CAT TTA AGA AAA CTT GTC CCT GGG TTT GGA AAA GCA TAT Arg Leu Ser His Leu Arg Lys Leu Val Pro Gly Phe Gly Lys Ala Tyr 300 305 310 315	1008
AAC ATA TTC AAC AAG ACC TTG ATG GAA GGC GAT GCT CAC TAC AAG TCA Thr Ile Phe Asn Lys Thr Leu Met Glu Ala Asp Ala His Tyr Lys Ser 320 325 330	1056
GTC AGA ACT TGG AAT GAG ATC CTC CCT TCA AAA GGG TGT TTA AGA GTT Val Arg Thr Trp Asn Glu Ile Leu Pro Ser Lys Gly Cys Leu Arg Val 335 340 345	1104
GGG GGG AGG TGT CAT CCT CAT GTG AAC GGG GTG TTT TTC AAT GGT ATA Gly Gly Arg Cys His Pro His Val Asn Gly Val Phe Asn Gly Ile 350 355 360	1152
ATA TTA GGA CCT GAC GGC AAT GTC TTA ATC CCA GAG ATG CAA TCA TCC Ile Leu Gly Pro Asp Gly Asn Val Leu Ile Pro Glu Met Gln Ser Ser 365 370 375	1200
CTC CTC CAG CAA CAT ATG GAG TTG TTG GAA TCC TCG GTT ATC CCC CTT Leu Leu Gln Gln His Met Glu Leu Leu Glu Ser Ser Val Ile Pro Leu 380 385 390 395	1248

GTG CAC CCC CTG CCA GAC CGG TCT ACC GTT TTC AAG GAC GGT GAC GAG	1296
Val His Pro Leu Ala Asp Pro Ser Thr Val Phe Lys Asp Gly Asp Glu	
400	405
410	
CCT GAG GAT TTT GTT GAA GTT CAC CTT CCC GAT GTG CAC AAT CAG GTC	1344
Ala Glu Asp Phe Val Glu Val His Leu Pro Asp Val His Asn Gln Val	
415	420
425	
TCA GGA GTT GAC TTG GGT CTC CGG AAC TGG GGG AAG TAT GTA TTA CTG	1392
Ser Gly Val Asp Leu Gly Leu Pro Asn Trp Gly Lys Tyr Val Leu Leu	
430	435
440	
AGT GCA GGG GCC CTG ACT GCC TTG ATG TTG ATA ATT TTC CTG ATG ACA	1440
Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr	
445	450
455	
TGT TGT AGA AGA GTC AAT CGA TCA GAA CCT ACG CAA CAC AAT CTC AGA	1488
Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg	
460	465
470	475
GGG ACA GGG AGG GAG GTG TCA GTC ACT CGC CAA AGC GGG AAG ATC ATA	1536
Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile	
480	485
490	
TCT TCA TGG GAA TCA CAC AAG AGT CGG GGT GAG ACC AGA CTG TGAGGACTGG	1588
Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu	
495	500
505	
CGGTCCCTTC AAOGATOCAA GTCCTGAAGA TCACCTCCCC TTGGGGGGTT CTTTTGAAA	1648
AAAAAAAAAAAA AAAA	
	1664

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 524 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu  
 -19                    -15                    -10                    -5

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Tyr Thr Ile Pro Asp Lys Leu Gly Pro  
 1                    5                    10

Trp Ser Pro Ile Asp Ile His His Leu Ser Cys Pro Asn Asn Leu Val  
 15                    20                    25

Val Glu Asp Glu Gly Cys Thr Asn Leu Ser Gly Phe Ser Tyr Met Glu

30	35	40	45
Leu Lys Val Gly Tyr Ile Leu Ala Ile Lys Met Asn Gly Phe Thr Cys			
50	55	60	
Thr Gly Val Val Thr Glu Ala Glu Thr Tyr Thr Asn Phe Val Gly Tyr			
65	70	75	
Val Thr Thr Thr Phe Lys Arg Lys His Phe Arg Pro Thr Pro Asp Ala			
80	85	90	
Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Trp Lys Met Ala Gly Asp Pro Arg Tyr Glu			
95	100	105	
Glu Ser Leu His Asn Pro Tyr Pro Asp Tyr Arg Trp Leu Arg Thr Val			
110	115	120	125
Lys Thr Thr Lys Glu Ser Leu Val Ile Ile Ser Pro Ser Val Ala Asp			
130	135	140	
Leu Asp Pro Tyr Asp Arg Ser Leu His Ser Arg Val Phe Pro Ser Gly			
145	150	155	
Lys Cys Ser Gly Val Ala Val Ser Ser Thr Tyr Cys Ser Thr Asn His			
160	165	170	
Asp Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg Leu Gly Met Ser Cys			
175	180	185	
Asp Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala Ser Lys Gly Ser Glu			
190	195	200	205
Thr Cys Gly Phe Val Asp Glu Arg Gly Leu Tyr Lys Ser Leu Lys Gly			
210	215	220	
Ala Cys Lys Leu Lys Leu Cys Gly Val Leu Gly Leu Arg Leu Met Asp			
225	230	235	
Gly Thr Trp Val Ala Met Gln Thr Ser Asn Glu Thr Lys Trp Cys Pro			
240	245	250	
Pro Asp Gln Leu Val Asn Leu His Asp Phe Arg Ser Asp Glu Ile Glu			
255	260	265	
His Leu Val Val Glu Glu Leu Val Arg Lys Arg Glu Glu Cys Leu Asp			
270	275	280	285
Ala Leu Glu Ser Ile Met Thr Thr Lys Ser Val Ser Phe Arg Arg Leu			
290	295	300	
Ser His Leu Arg Lys Leu Val Pro Gly Phe Gly Lys Ala Tyr Thr Ile			
305	310	315	
Phe Asn Lys Thr Leu Met Glu Ala Asp Ala His Tyr Lys Ser Val Arg			
320	325	330	

Thr Trp Asn Glu Ile Leu Pro Ser Lys Gly Cys Leu Arg Val Gly Gly  
 335 340 345  
 Arg Cys His Pro His Val Asn Gly Val Phe Phe Asn Gly Ile Ile Leu  
 350 355 360 365  
 Gly Pro Asp Gly Asn Val Leu Ile Pro Glu Met Gln Ser Ser Leu Leu  
 370 375 380  
 Gln Gln His Met Glu Leu Leu Glu Ser Ser Val Ile Pro Leu Val His  
 385 390 395  
 Pro Leu Ala Asp Pro Ser Thr Val Phe Lys Asp Gly Asp Glu Ala Glu  
 400 405 410  
 Asp Phe Val Glu Val His Leu Pro Asp Val His Asn Gln Val Ser Gly  
 415 420 425  
 Val Asp Leu Gly Leu Pro Asn Trp Gly Lys Tyr Val Leu Leu Ser Ala  
 430 435 440 445  
 Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys  
 450 455 460  
 Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr  
 465 470 475  
 Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser  
 480 485 490  
 Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu  
 495 500 505

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..24

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GTCAACAGCG CACCCACTTC AAGC

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR  
(B) LAGE: 1..24

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GCTTGTGAG ATGATGCTTT GACA

24

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR  
(B) LAGE: 1..21

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGTCCTGTGT CTGAACCTGA G

21

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR  
(B) LAGE: 1..21

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

TTATGGCCTG GGGCGTTTAC A

21

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 41 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (ix) MERKMALE:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptide  
(B) LAGE: 1..41

- (ix) MERKMALE:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
(B) LAGE: 17  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Xaa ist Nle"

- (ix) MERKMALE:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
(B) LAGE: 25  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Xaa ist Nle"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly  
1 5 10 15

Xaa Ile Asp Gly Lys Gly Asp Ile Xaa Gly Glu Trp Gly Asn Glu Ile  
20 25 30

Phe Gly Glu Ile Ala Glu Phe Leu Gly  
35 40

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Krebsvakzinen, die autologe Tumorzellen enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß man Tumorzellen oder Fibroblasten kultiviert und die kultivierten Zellen ex vivo mit einer Zusammensetzung transfiziert, die folgende Komponenten enthält:
  - ai) ein DNA-Molekül, das eine oder mehrere in der Zelle exprimierbare Sequenzen enthält, die für ein oder mehrere, gleiche oder verschiedene, immunstimulierende Polypeptide kodieren, oder mehrere DNA-Moleküle, enthaltend für verschiedene immunstimulierende Polypeptide kodierende Sequenzen;
  - aii) gegebenenfalls ein weiteres DNA-Molekül, das frei ist von Sequenzen, kodierend für ein in der zu transfizierenden Zelle funktionell aktives Polypeptid;
  - b) ein Konjugat zwischen einem DNA-bindenden Molekül und einem endosomolytisch wirkenden Mittel, ausgewählt aus der Gruppe
    - i) Adenovirus, das eine Mutation zumindest in der E4-Region aufweist,
    - ii) Adenovirus, das neben einem Effekt in der E1A-Region einen oder mehrere weitere genetische Defekte aufweist, oder
    - iii) endosomolytisch wirkendes Peptid;
  - gegebenenfalls
  - c) ein DNA-bindendes Molekül, vorzugsweise konjugiert mit einem Internalisierungsfaktor, der an ein Oberflächenmolekül der zu transfizierenden Zellen bindet und in diese internalisiert wird;

wobei die Komponenten b) und c) mit der in a) definierten DNA einen im wesentlichen elektroneutralen Komplex bilden,

daß man die transfizierten Zellen derart inaktiviert, daß sie unter Beibehaltung ihrer Fähigkeit zur Expression der in ai) definierten DNA ihre Fähigkeit zur Teilung verlieren, wobei man im Falle der Transfektion von Fibroblasten diese mit nichttransfizierten sowie inaktivierten Tumorzellen mischt,

und daß man die Zellpopulation gegebenenfalls mit pharmazeutisch annehmbaren Hilfs- und Trägerstoffen mischt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA ein Expressionsplasmid ist, das eine oder mehrere für ein Zytokin kodierende Sequenz(en) enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA die für humanes Interleukin 2 kodierende Sequenz enthält.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA die für humanes IFN- $\gamma$  kodierende Sequenz enthält.
5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als in ai) definierte DNA zwei Plasmide eingesetzt werden, von denen eines die für humanes Interleukin 2 und eines die für IFN- $\gamma$  kodierende Sequenz enthält.

6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA die für humanen Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierenden Faktor (GM-CSF) kodierende Sequenz enthält.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA ein Expressionsplasmid ist, das eine oder mehrere für ein co-stimulierendes Molekül kodierende Sequenz(en) enthält.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eine für das Heat Stable Antigen kodierende Sequenz enthält.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA ein Expressionsplasmid ist, das eine oder mehrere für ein Neoantigen kodierende Sequenz(en) enthält.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Neoantigen ein Virusprotein oder ein Fragment davon ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Virusprotein das Rabies-Glycoprotein ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich als in aii) definiertes DNA-Molekül ein Plasmid eingesetzt wird, das frei ist von Sequenzen, kodierend für ein in der zu transfizierenden Zelle funktionell aktives Polypeptid.
13. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als DNA-bindendes Molekül b) und gegebenenfalls c) ein Polylysin, vorzugsweise einer

Kettenlänge von ca. 200 bis 300 Lysinresten,  
eingesetzt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet,  
daß das Polylysin in c) mit humanem Transferrin als  
Internalisierungsfaktor konjugiert ist.
15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet,  
daß das Polylysin in c) mit humanem EGF als  
Internalisierungsfaktor konjugiert ist.
16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß als Komponente b) ein Konjugat eingesetzt wird,  
das ein Adenovirus mit einem Defekt zumindest in der  
E4-Region enthält.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet,  
daß als E4-Mutante das Adenovirus der Bezeichnung  
d11014 eingesetzt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß als Komponente b) ein Konjugat eingesetzt wird,  
das ein Adenovirus mit einem Defekt in der Ela-  
Region, das zusätzlich mittels Psoralen/UV  
inaktiviert wurde, enthält.
19. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß als Komponente b) ein Konjugat eingesetzt wird,  
das ein Adenovirus enthält, das mittels  
β-Propiolacton inaktiviert wurde.
20. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß als Komponente b) ein Konjugat eingesetzt wird,  
in dem das Peptid der Sequenz SEQ ID NO:7 ionisch an  
Polylysin gebunden ist.

21. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die transfizierten Zellen mit Röntgen- oder Gammastrahlen inaktiviert werden.
22. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen Melanomzellen sind.
23. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen Colonkarzinomzellen sind.
24. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Fibroblasten transfiziert und inaktiviert werden.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Fibroblasten autologe Fibroblasten sind.
26. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Fibroblasten Zellen einer Fibroblastenzelllinie sind.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die transfizierten und inaktivierten Fibroblasten mit autologen inaktivierten Tumorzellen gemischt werden.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen Melanomzellen sind.
29. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen Colonkarzinomzellen sind.
30. Krebsvakzine, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 29.

31. Transfektionskomplex zuer Herstellung von Krebsvakzinen, dadurch gekennzeichnet, daß er folgende Komponenten enthält:
- ai) ein DNA-Molekül, das eine oder mehrere in der Zelle exprimierbare Sequenzen enthält, die für ein oder mehrere, gleiche oder verschiedene, immunstimulierende Polypeptide kodieren, oder mehrere DNA-Moleküle, enthaltend für verschiedene immunstimulierende Polypeptide kodierende Sequenzen;
  - aii) gegebenenfalls ein weiteres DNA-Molekül, das frei ist von Sequenzen, kodierend für ein in der zu transfizierenden Zelle funktionell aktives Polypeptid;
  - b) ein Konjugat zwischen einem DNA-bindenden Molekül und einem endosomolytisch wirkenden Mittel, ausgewählt aus der Gruppe
    - i) Adenovirus, das eine Mutation zumindest in der E4-Region aufweist,
    - ii) Adenovirus, das neben einem Effekt in der ElA-Region einen oder mehrere weitere genetische Defekte aufweist, oder
    - iii) endosomolytisch wirkendes Peptid;
  - c) gegebenenfalls
    - c) ein DNA-bindendes Molekül, vorzugsweise konjugiert mit einem Internalisierungsfaktor, der an ein Oberflächenmolekül der zu transfizierenden Zellen bindet und in diese internalisiert wird, wobei die Komponenten b) und c) mit der in a) definierten DNA einen im wesentlichen elektroneutralen Komplex bilden.

32. Komplex nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA ein Expressionsplasmid ist, das eine oder mehrere für ein Zytokin kodierende Sequenz(en) enthält.
33. Komplex nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA die für humanes Interleukin 2 kodierende Sequenz enthält.
34. Komplex nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA die für humanes IFN- $\gamma$  kodierende Sequenz enthält.
35. Komplex nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA die für humanen GM-CSF kodierende Sequenz enthält.
36. Komplex nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA aus zwei Plasmiden besteht, von denen eines die für humanes Interleukin 2 und eines die für IFN- $\gamma$  kodierende Sequenz enthält.
37. Komplex nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA ein Expressionsplasmid ist, das eine oder mehrere für ein co-stimulierendes Molekül kodierende Sequenz(en) enthält.
38. Komplex nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eine für das Heat Stable Antigen kodierende Sequenz enthält.
39. Komplex nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die in ai) definierte DNA ein Expressionsplasmid

ist, das eine oder mehrere für ein Neoantigen kodierende Sequenz(en) enthält.

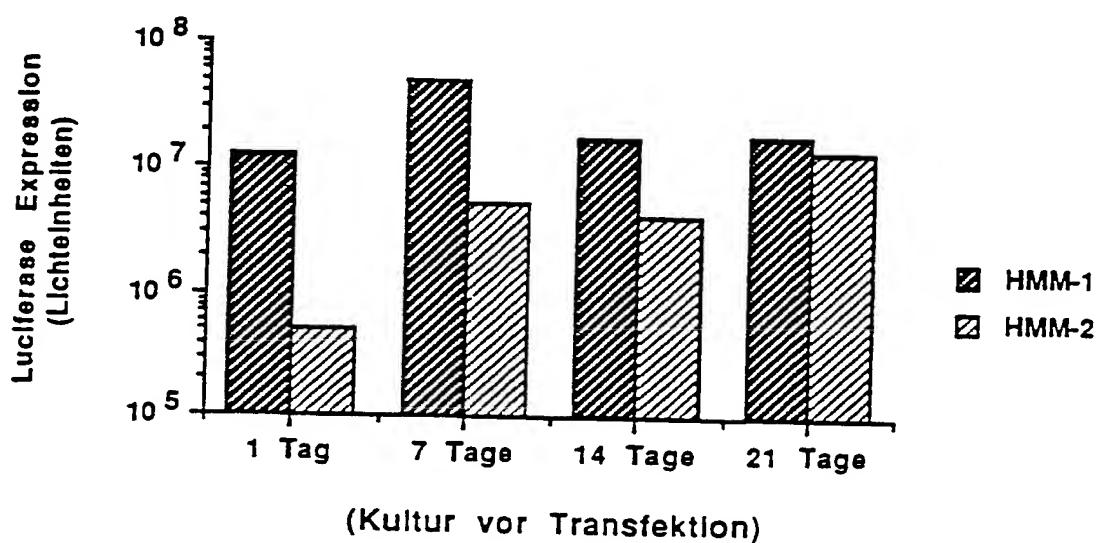
40. Komplex nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß das Neoantigen ein Virusprotein oder ein Fragment davon ist.
41. Komplex nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß das Virusprotein das Rabies-Glykoprotein ist.
42. Komplex nach einem der Ansprüche 31 bis 41, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich als in aii) definiertes DNA-Molekül ein Plasmid enthält, das frei ist von Sequenzen, kodierend für ein in der zu transfizierenden Zelle funktionell aktives Polypeptid.
43. Komplex nach einem der Ansprüche 31 bis 42, dadurch gekennzeichnet, daß die in ihm enthaltene DNA weitestgehend frei ist von Lipopolysacchariden.
44. Komplex nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß er als DNA-bindendes Molekül b) und gegebenenfalls c) ein Polylysin, vorzugsweise einer Kettenlänge von ca. 200 bis 300 Lysinen, enthält.
45. Komplex nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß das Polylysin in c) mit humanem Transferrin als Internalisierungsfaktor konjugiert ist.
46. Komplex nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß das Polylysin mit humanem EGF als Internalisierungsfaktor konjugiert ist.
47. Komplex nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß er als Komponente b) ein Konjugat enthält, das

ein Adenovirus mit einem Defekt zumindest in der E4-Region aufweist.

48. Komplex nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, daß er als E4-Mutante das Adenovirus der Bezeichnung d11014 enthält.
49. Komplex nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß er als Komponente b) ein Konjugat enthält, das ein Adenovirus enthält, das mittels  $\beta$ -Propiolacton inaktiviert wurde.
50. Komplex nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß er als Komponente b) ein Konjugat enthält, das ein Adenovirus mit einem Defekt in der Ela-Region, das zusätzlich mittels Psoralen/UV inaktiviert wurde, enthält.
51. Komplex nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß er als Komponente b) ein Konjugat enthält, in dem das Peptid der Sequenz SEQ ID NO:7 ionisch an Polylysin gebunden ist.
52. Humane Tumorzellen, transformiert mit einem der in einem der Ansprüche 31 bis 51 definierten Komplexe.
53. Humane Fibroblasten, transformiert mit einem der in einem der Ansprüche 31 bis 51 definierten Komplexe.
54. Fibroblasten nach Anspruch 53 in Mischung mit humanen Tumorzellen.
55. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend Zellen nach Anspruch 52 oder 54 und pharmazeutisch annehmbare Nähr- und Hilfsstoffe.

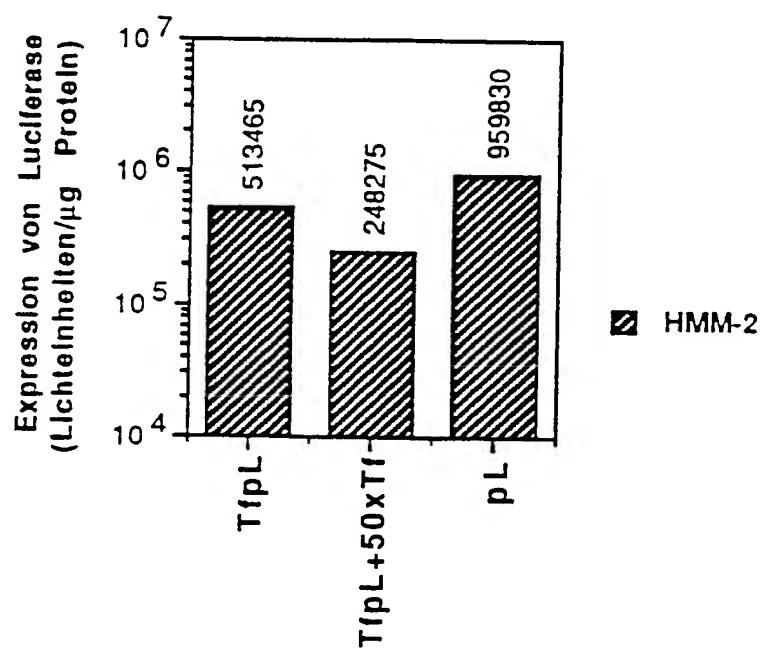
1/30

Fig. 1



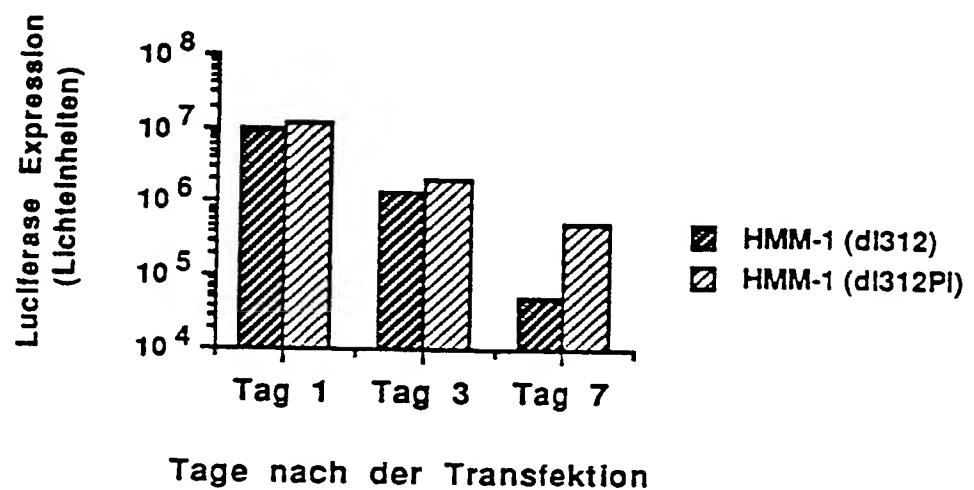
2/30

Fig. 2



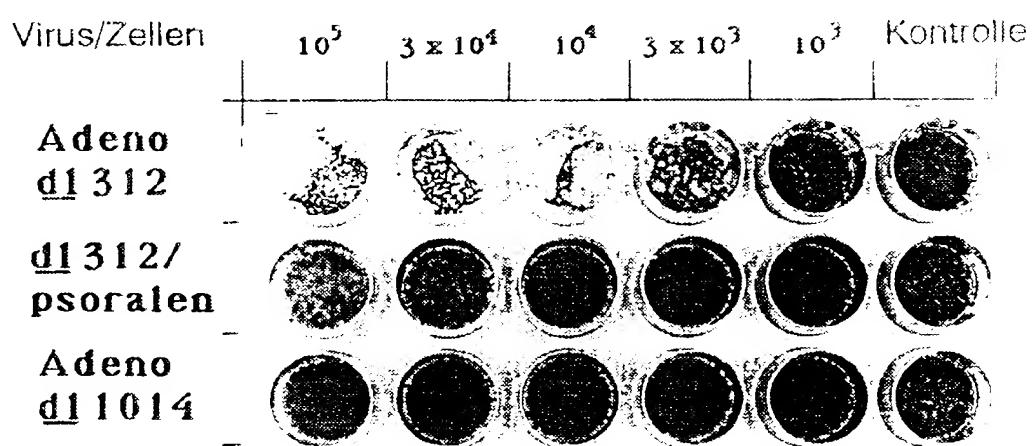
3/30

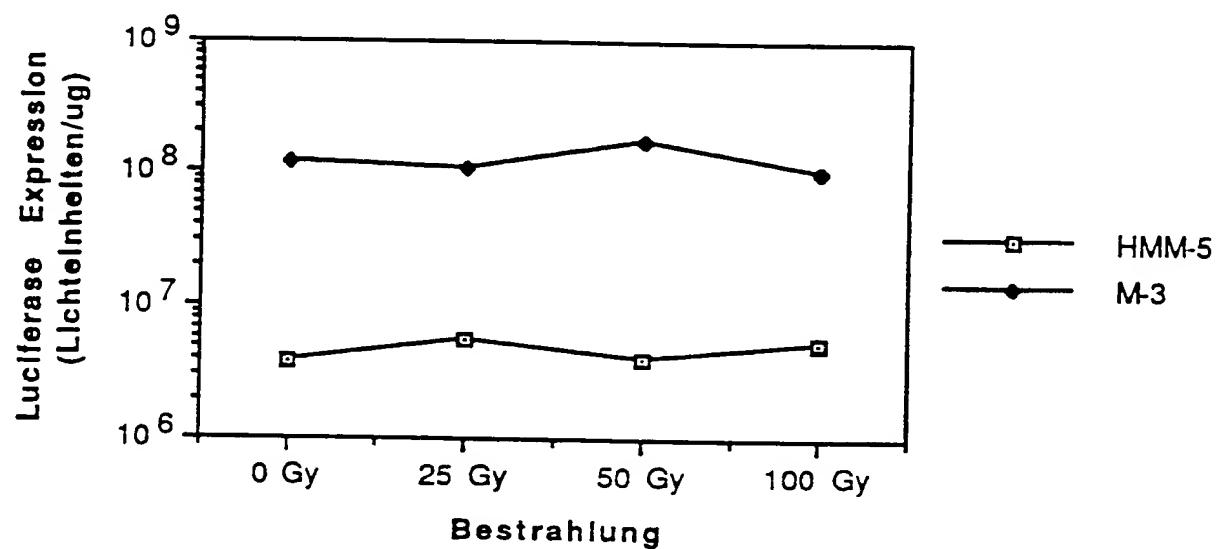
Fig. 3



4/30

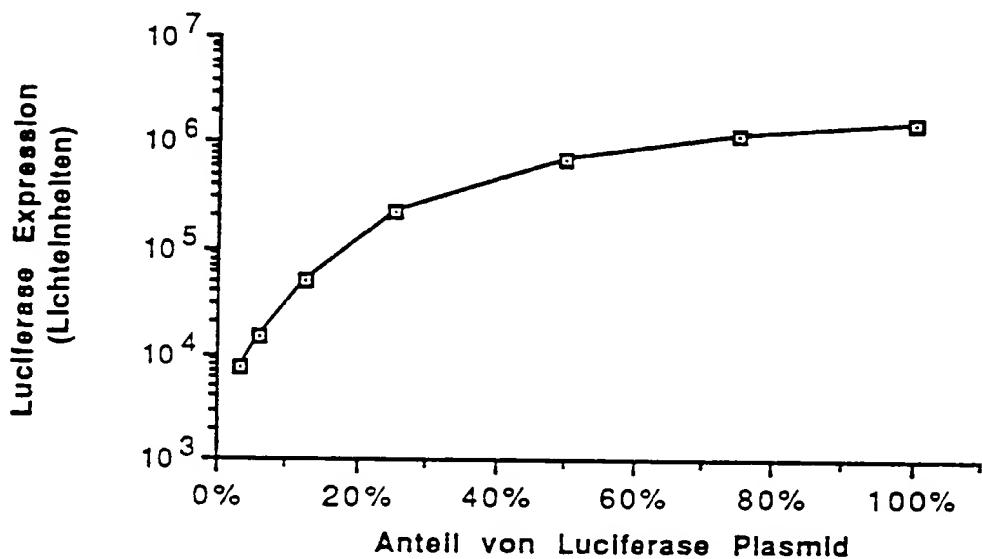
Fig. 4



5/30  
Fig. 5

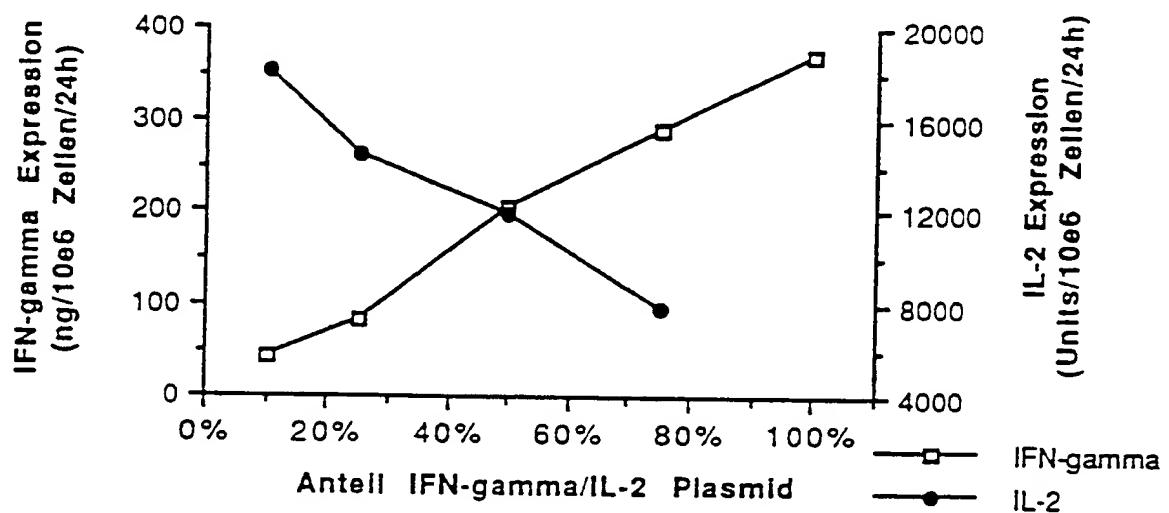
6/30

Fig. 6



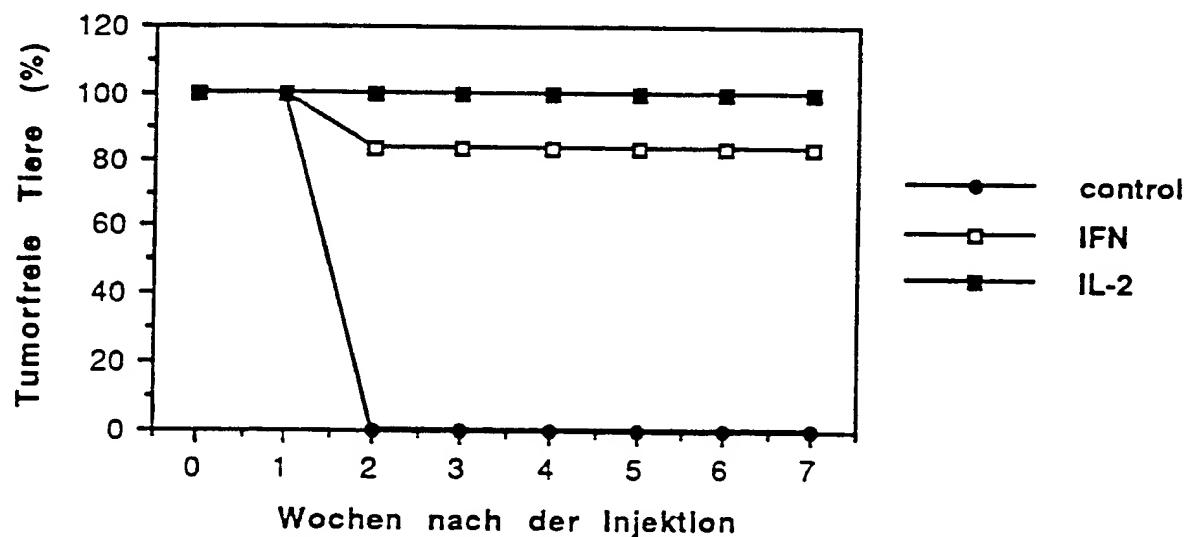
7/30

Fig. 7



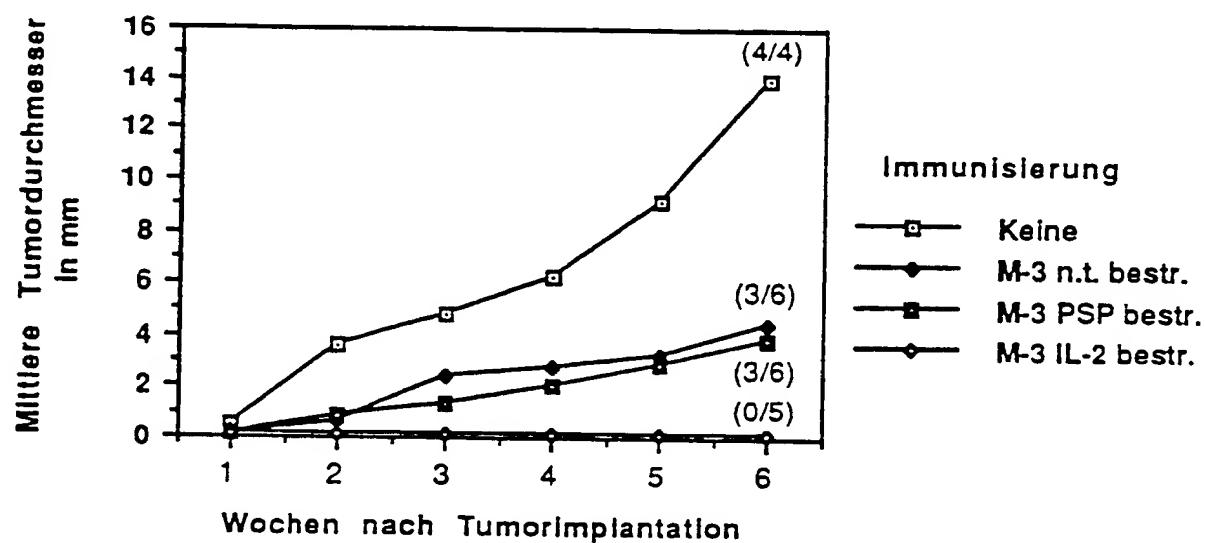
8/30

Fig. 8



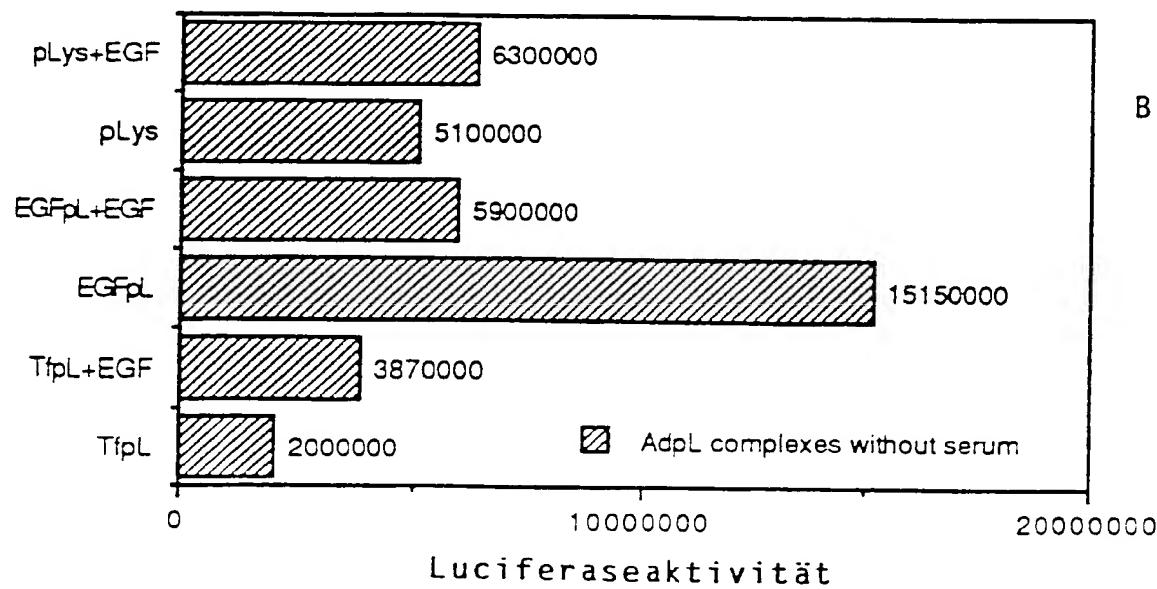
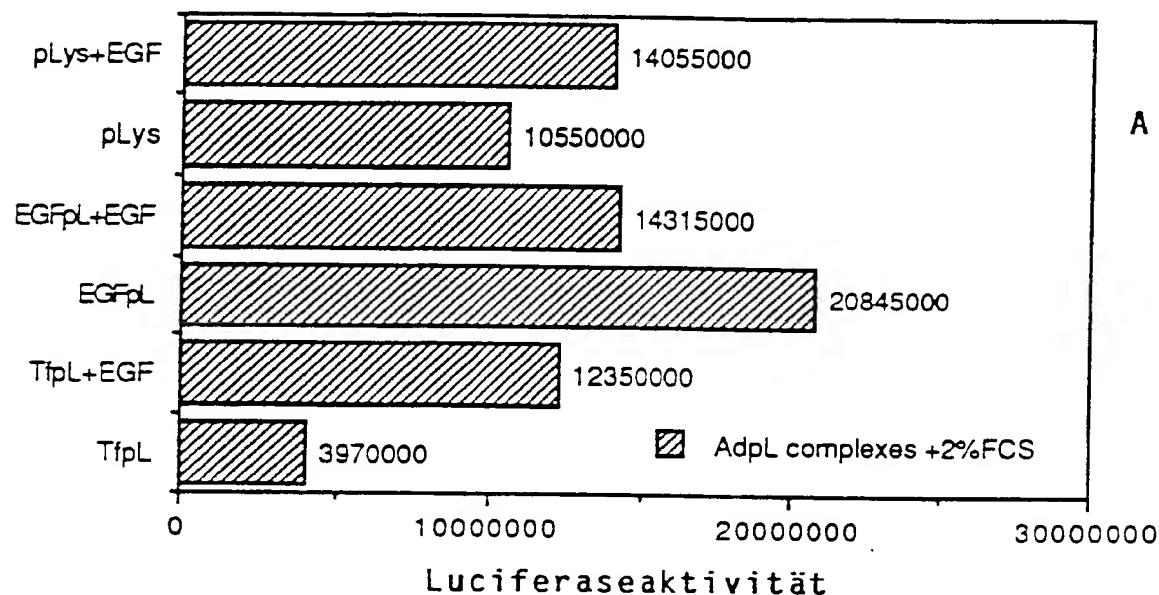
9/30

Fig. 9



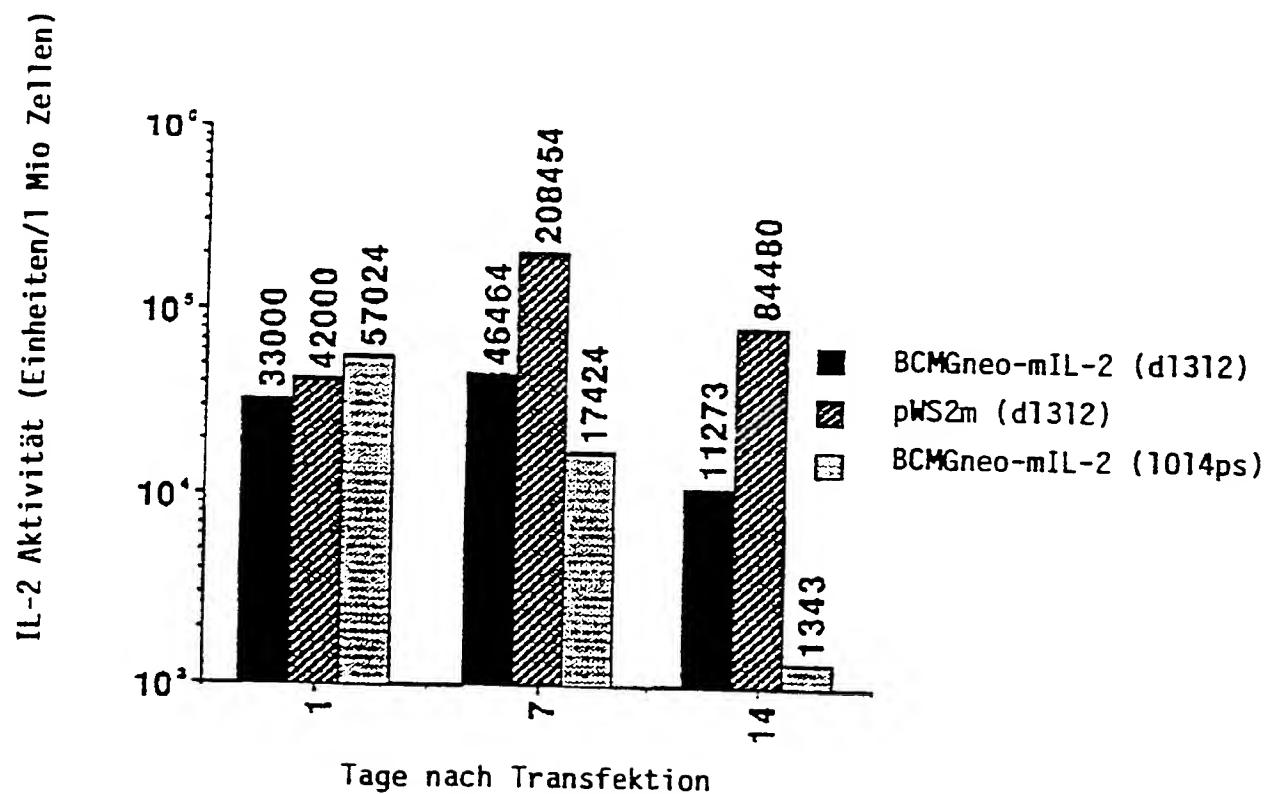
10/30

Fig. 10



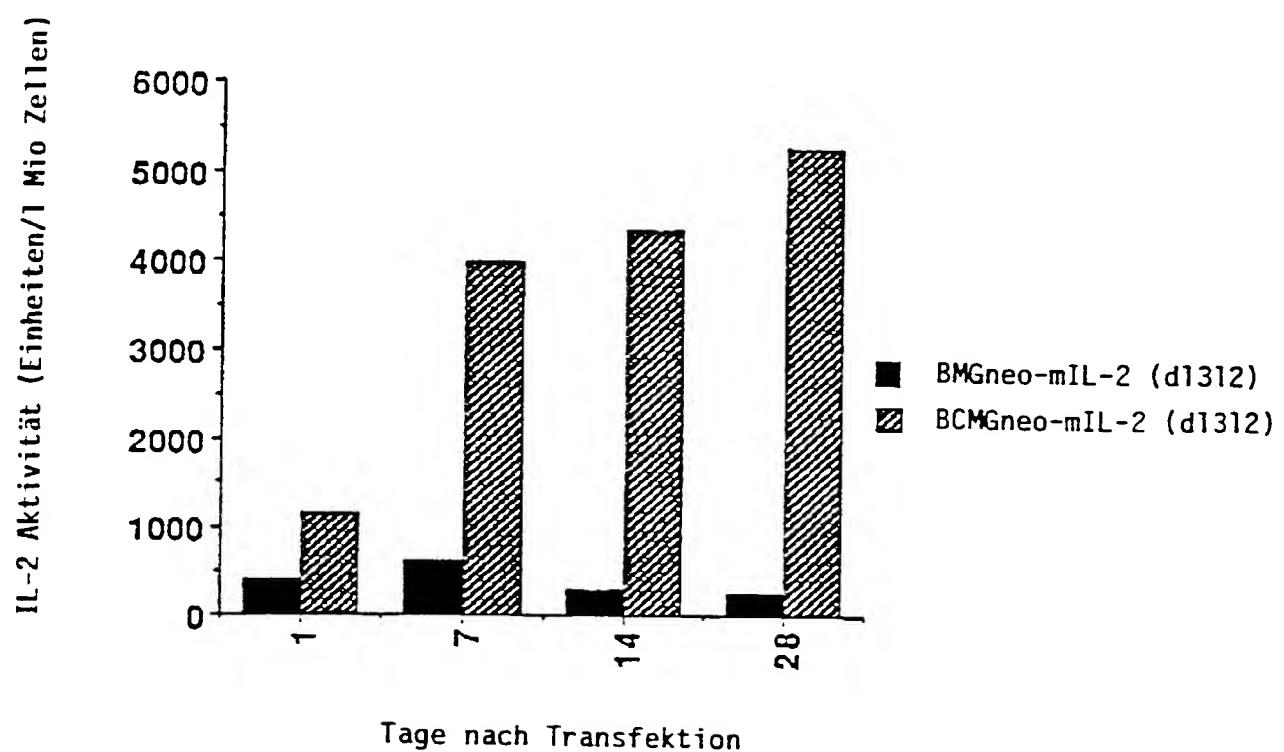
11/30

Fig. 11



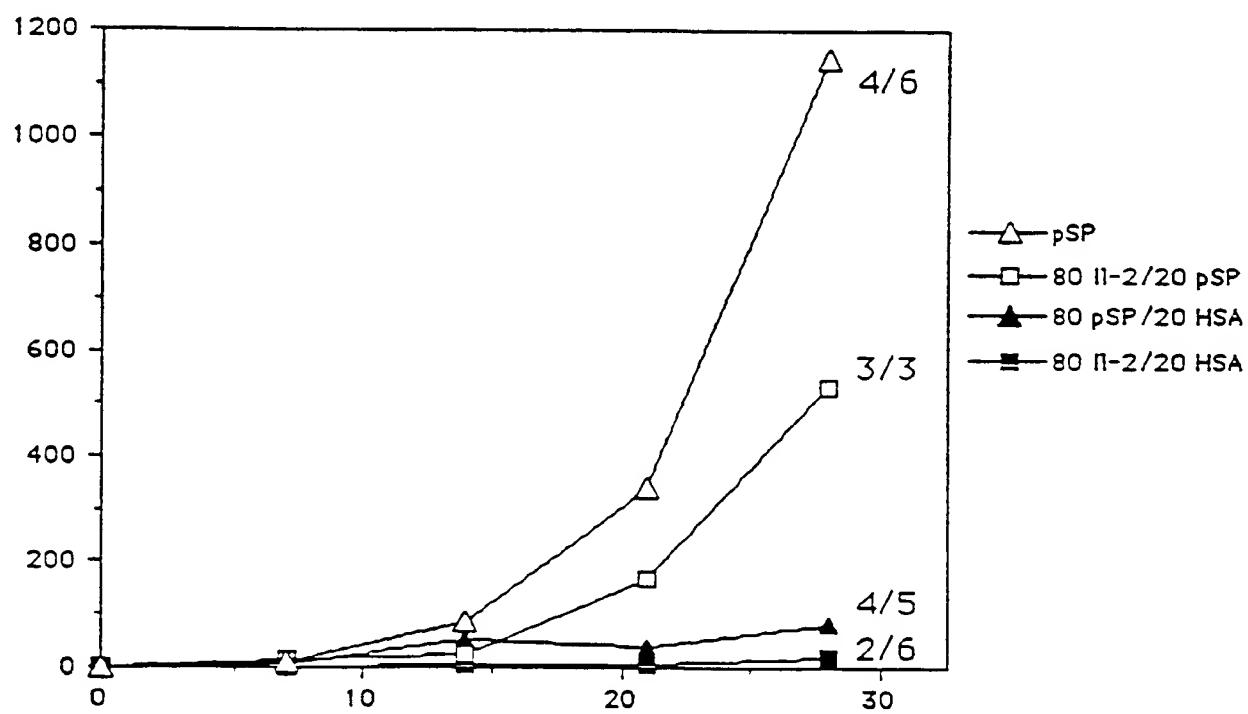
12/30

Fig. 12



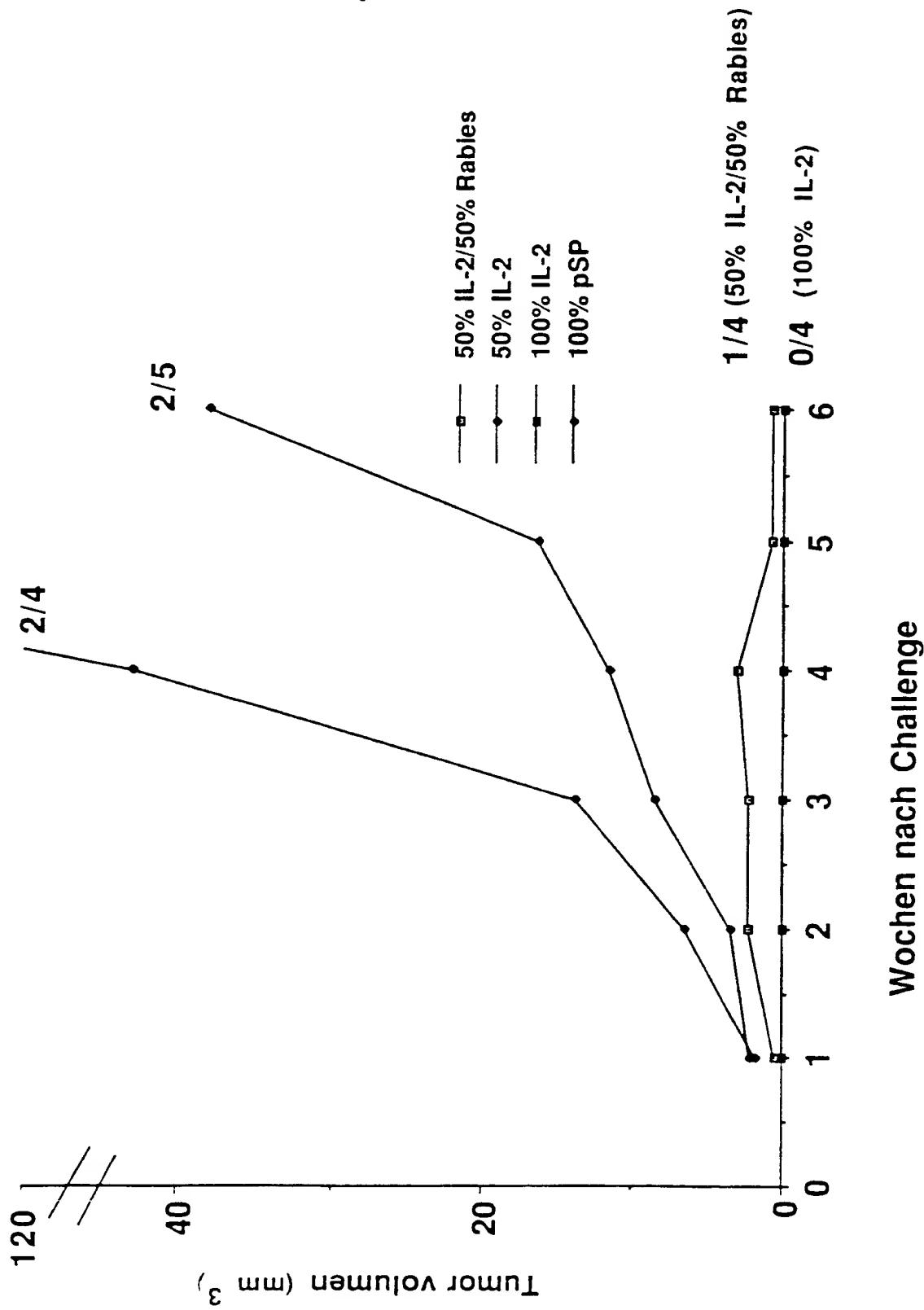
13/30

Fig. 13

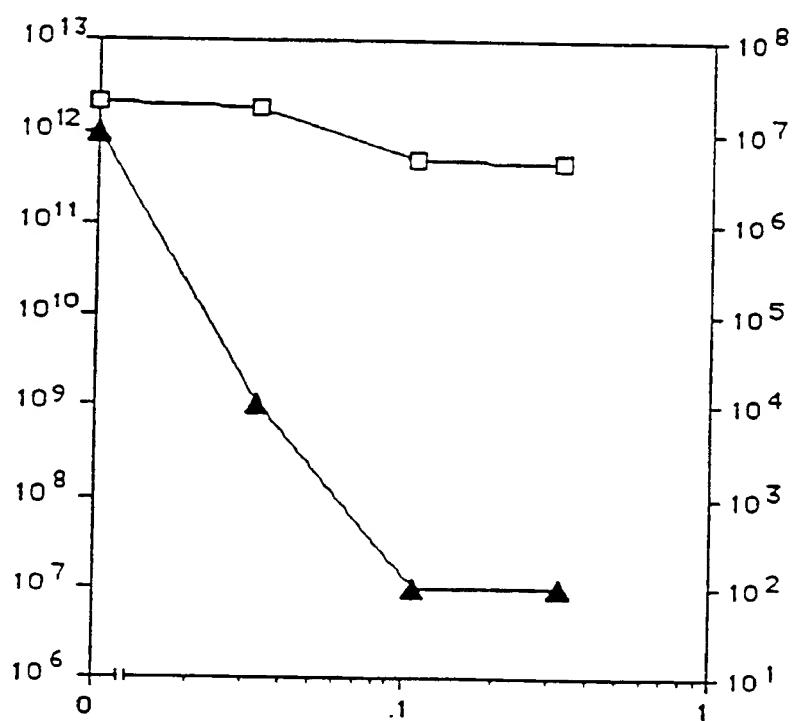


14/30

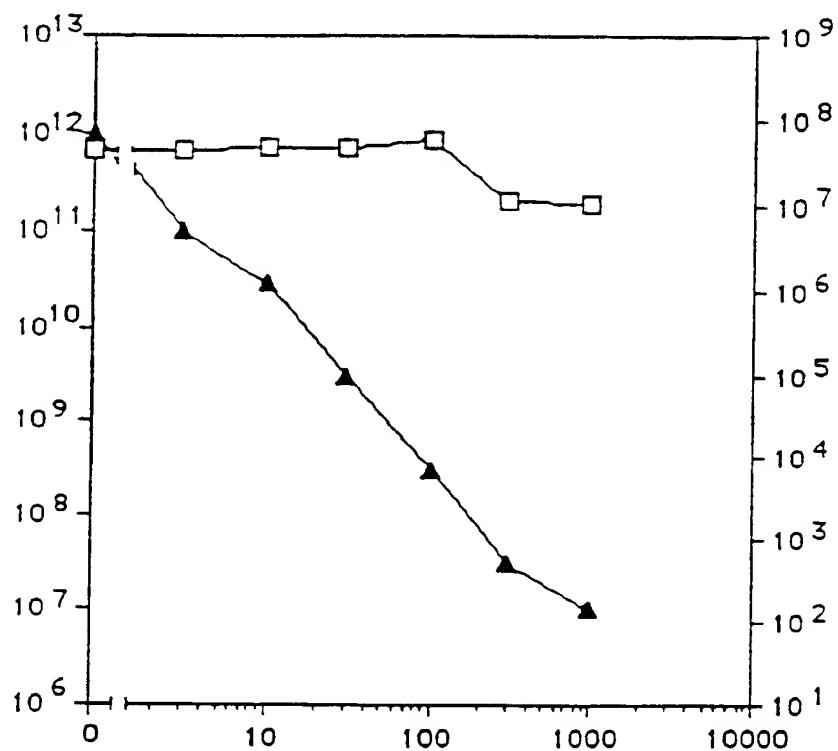
Fig. 14



15/30  
Fig. 15

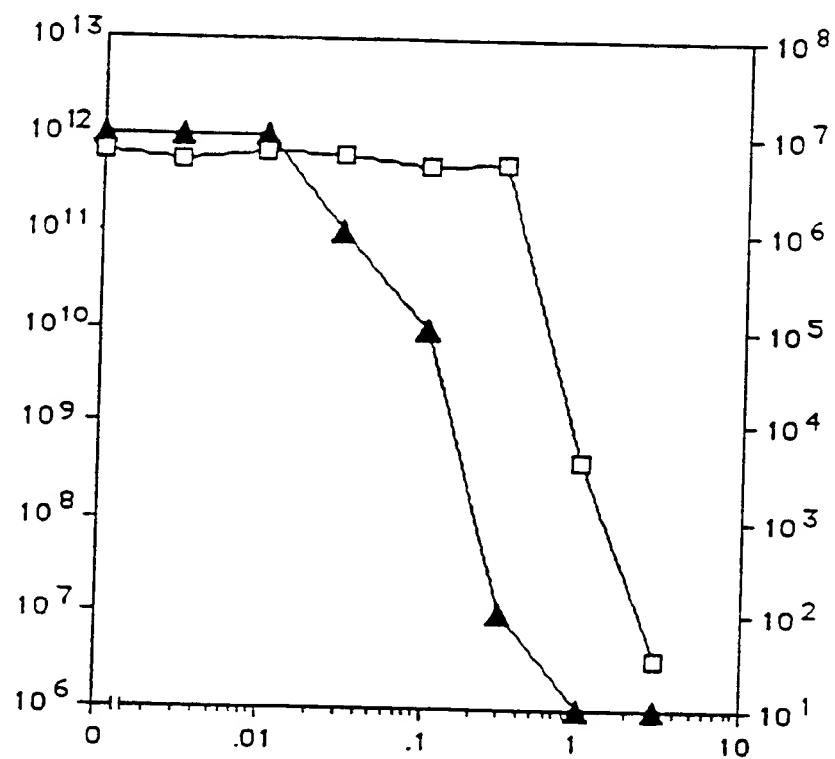


16/30  
Fig. 16

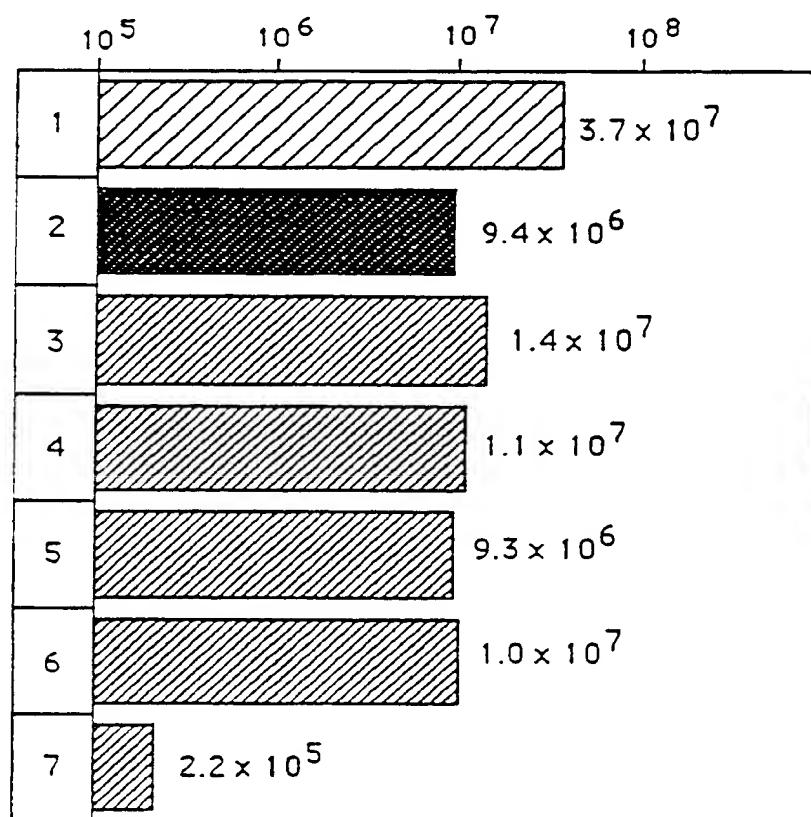


17/30

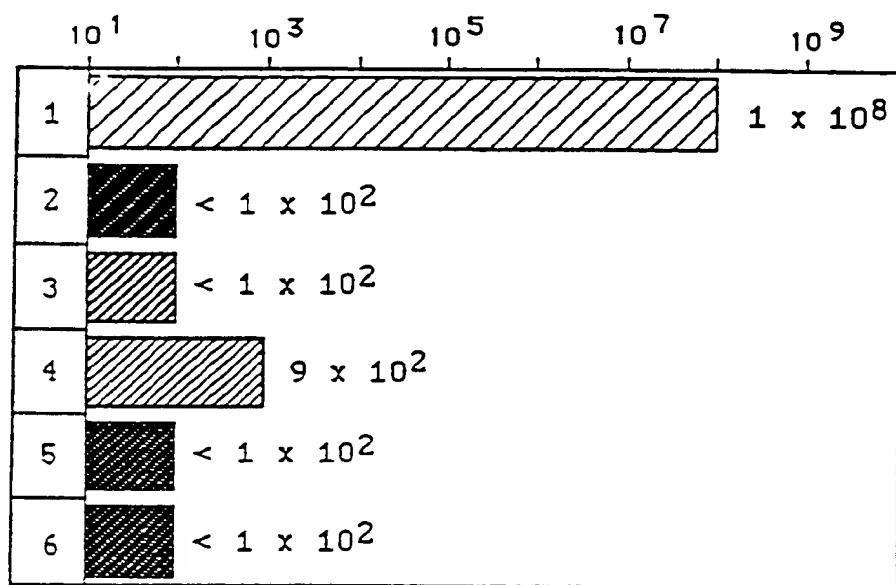
Fig. 17



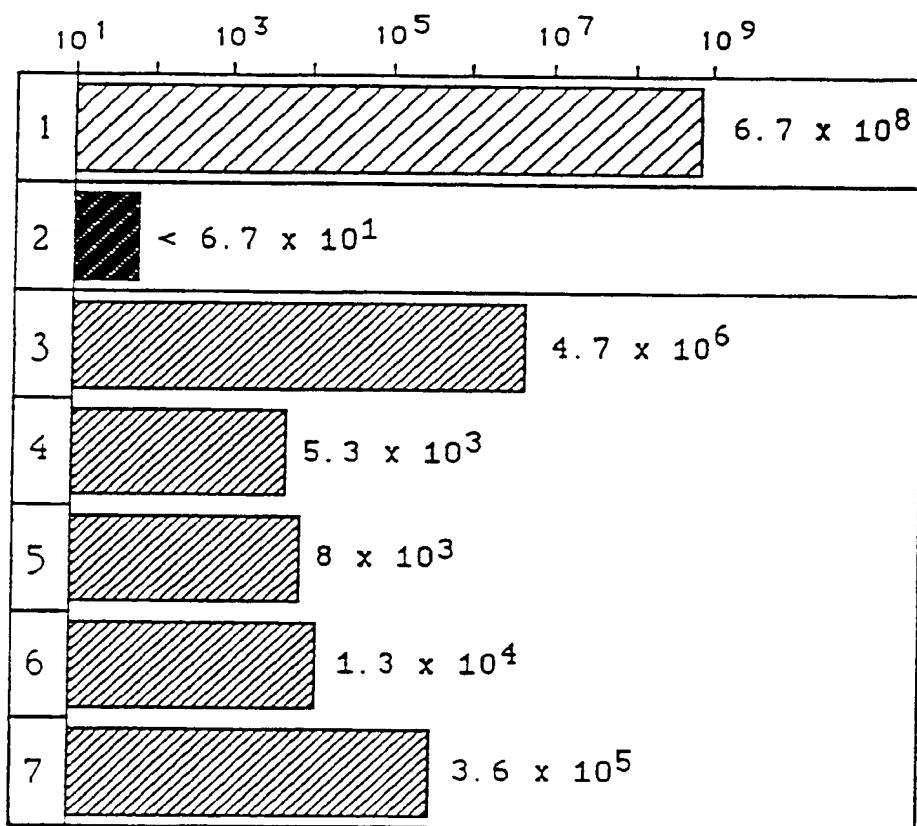
18/30  
Fig. 18



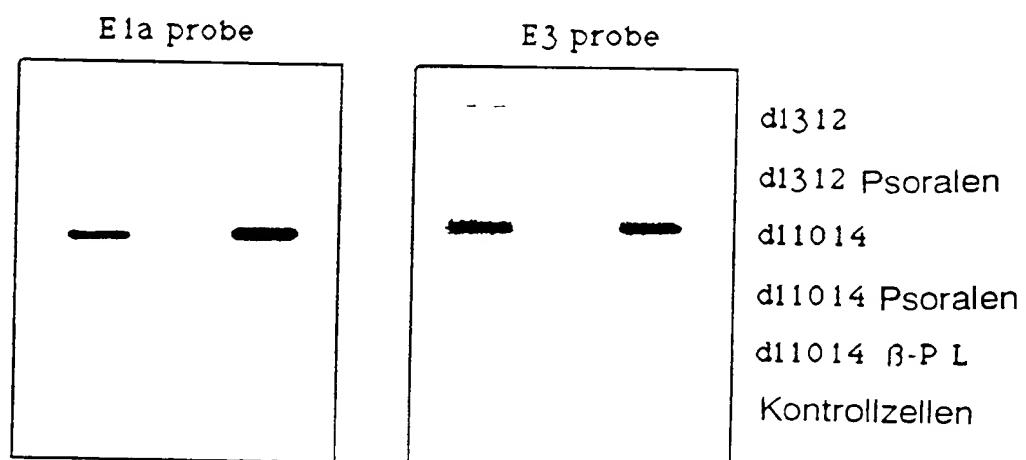
19/30  
Fig. 19



20/30  
Fig. 20



21/30  
Fig. 21



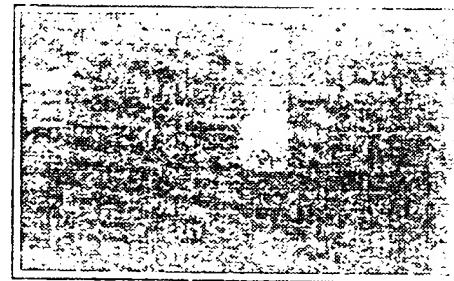
21/01  
Fig. 2a

Fig.

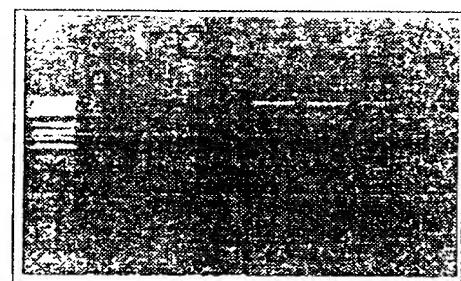
Fig.

dH014  
nicht-inaktiviert

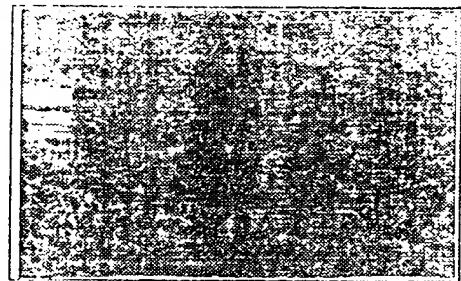
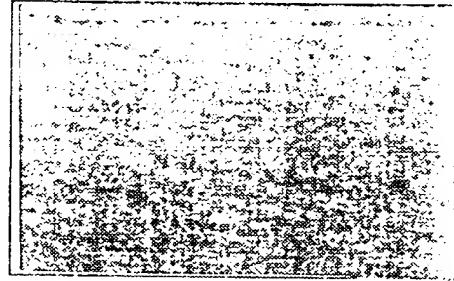
no RT



RT

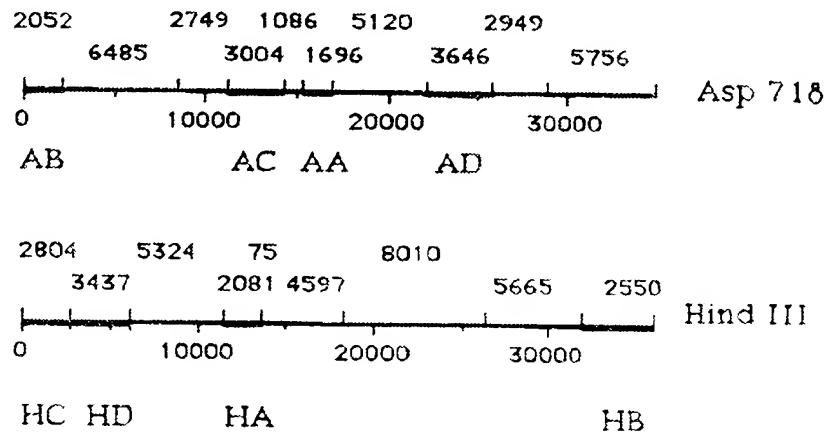
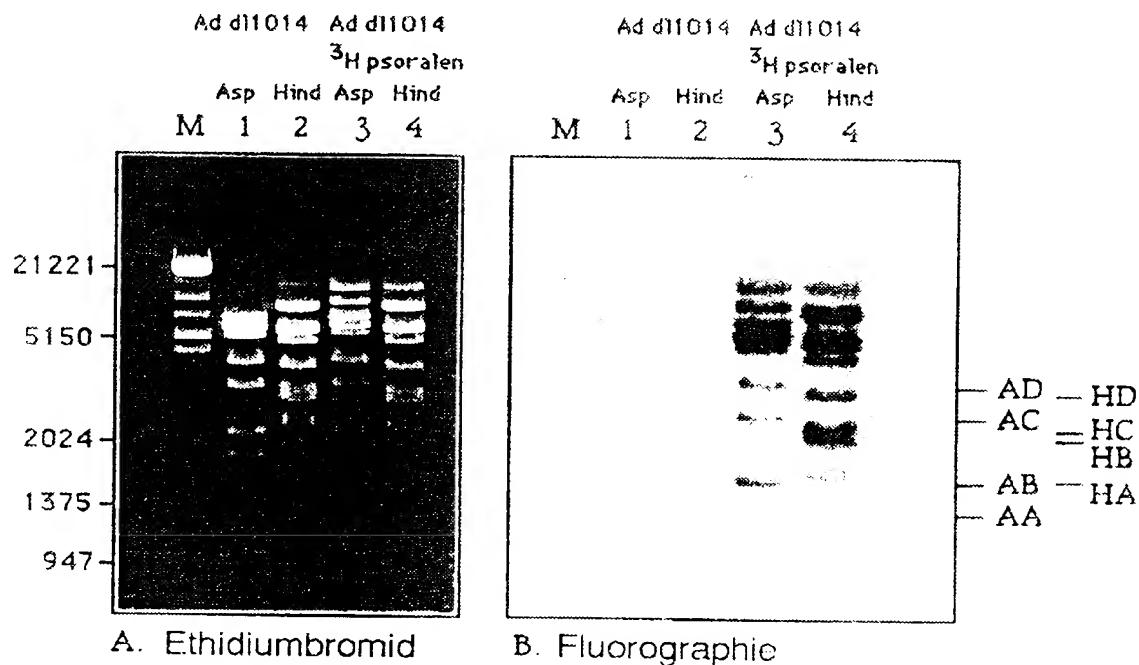


dH014  
Psoralen-  
inaktiviert



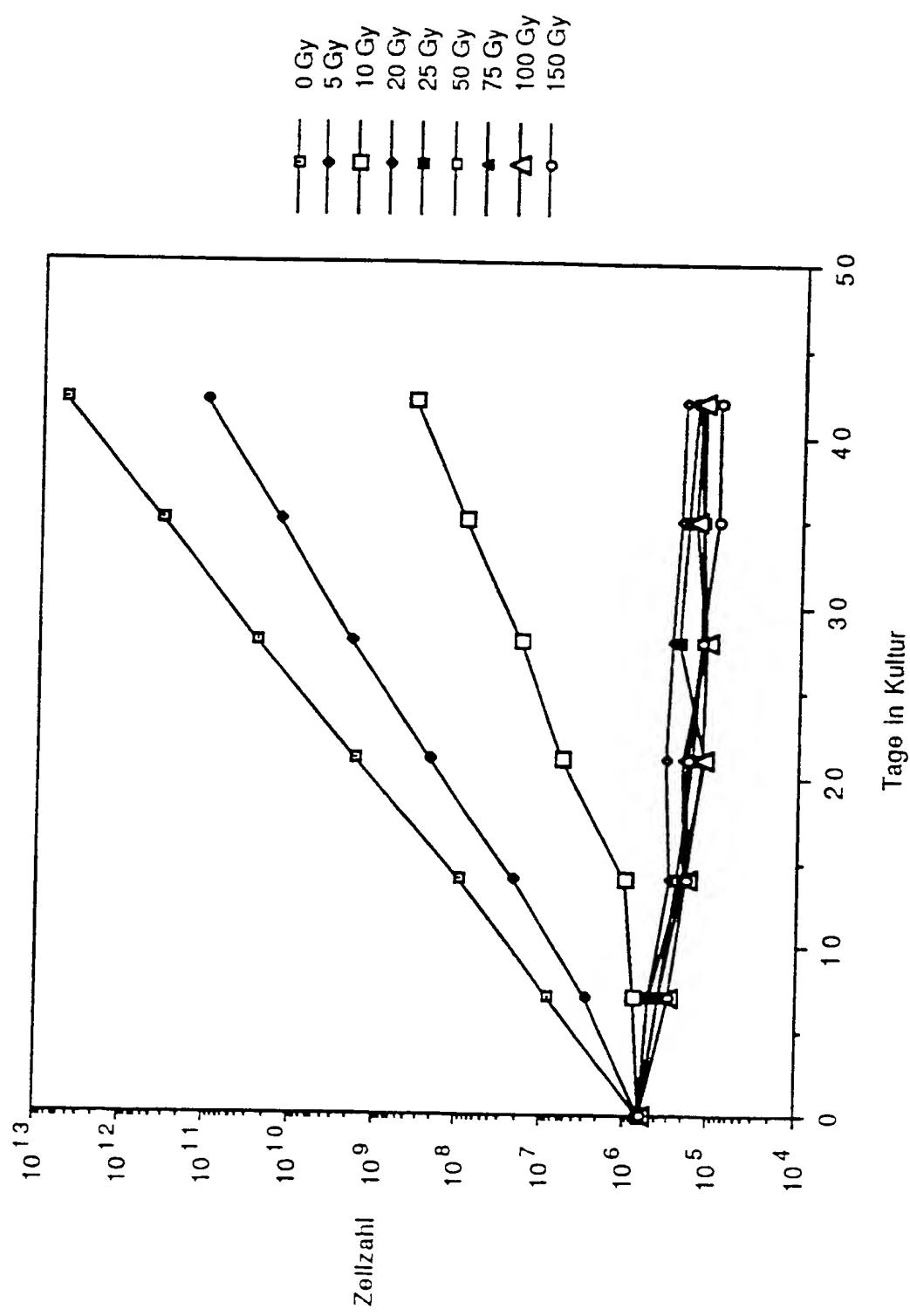
23/30

Fig. 23



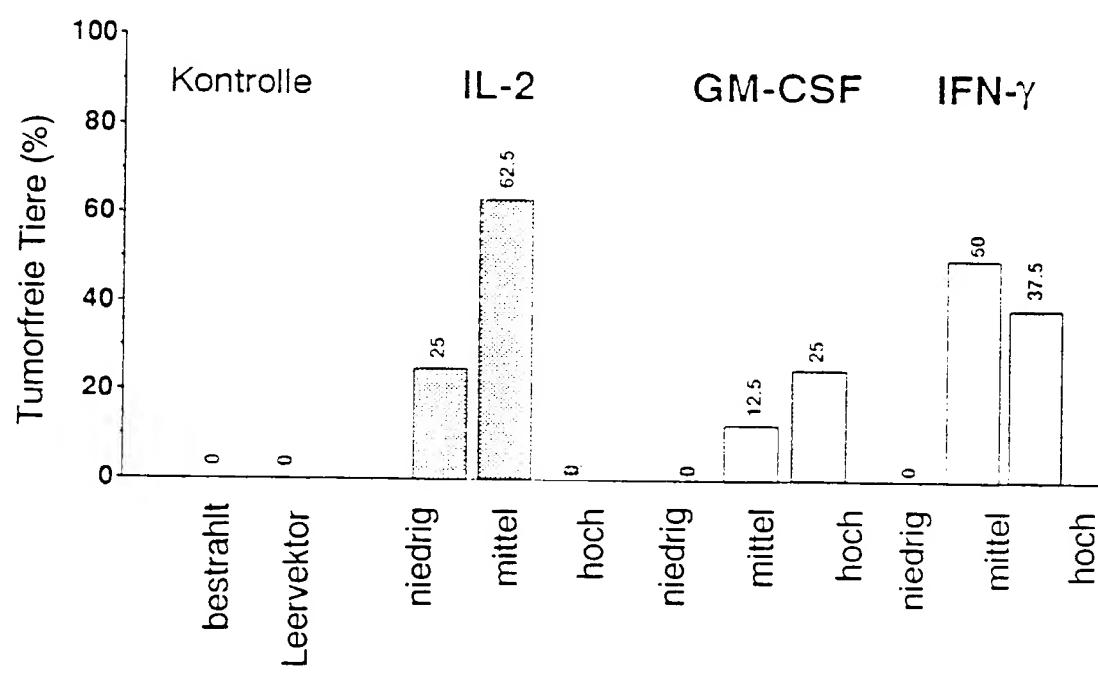
24/30

Fig. 24



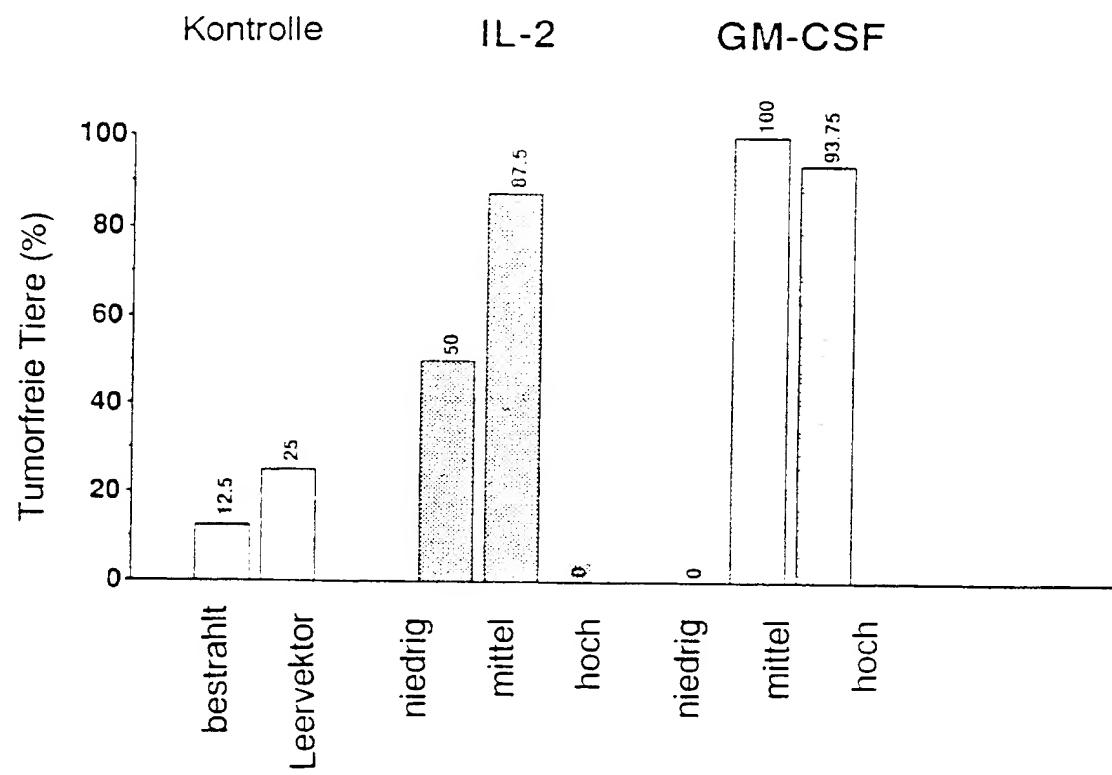
25/30

Fig. 25

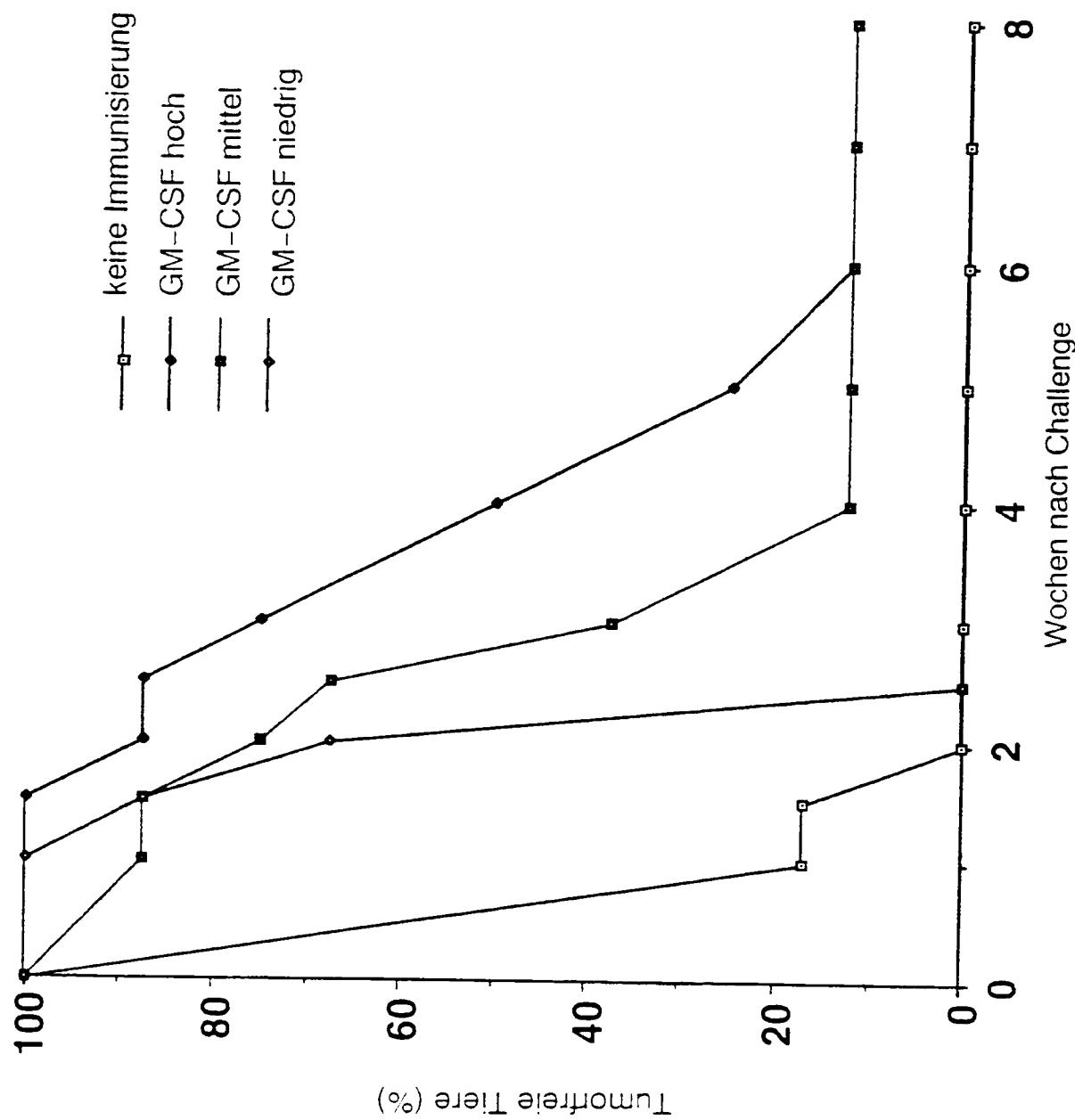


26/30

Fig. 26

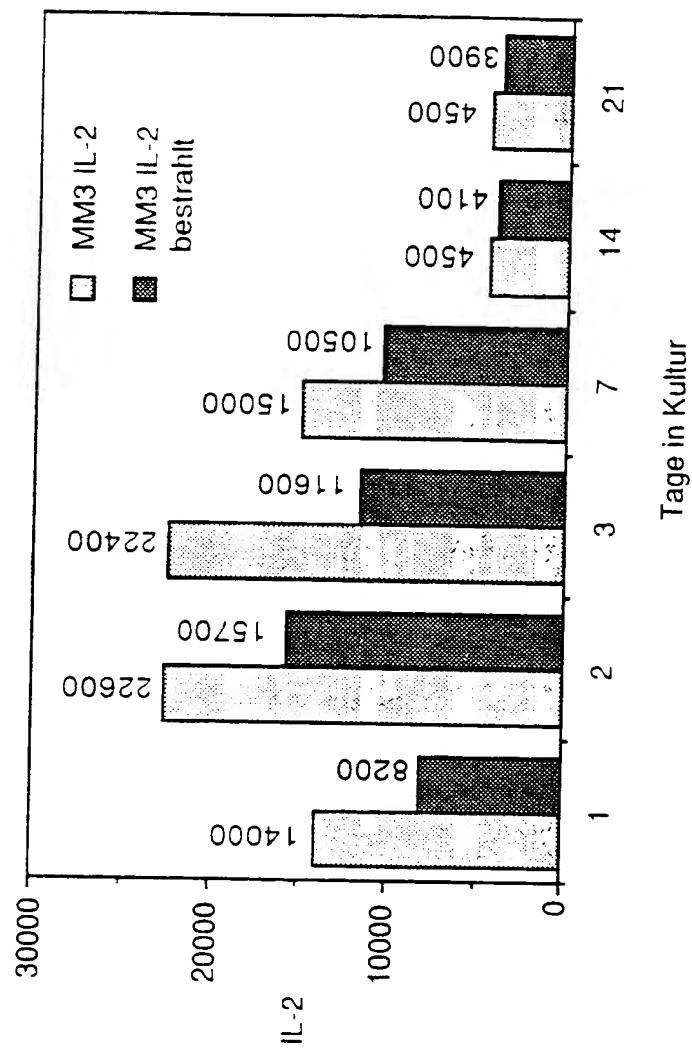


27/30  
Fig. 27



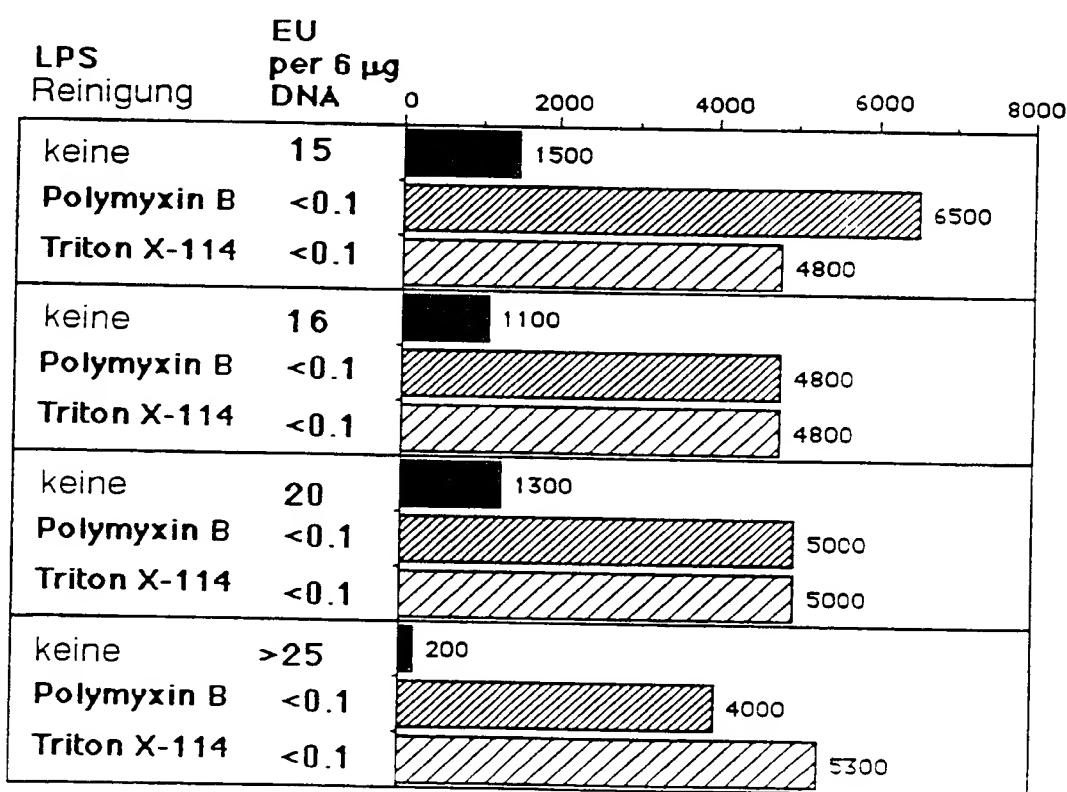
23/30

Fig. 28

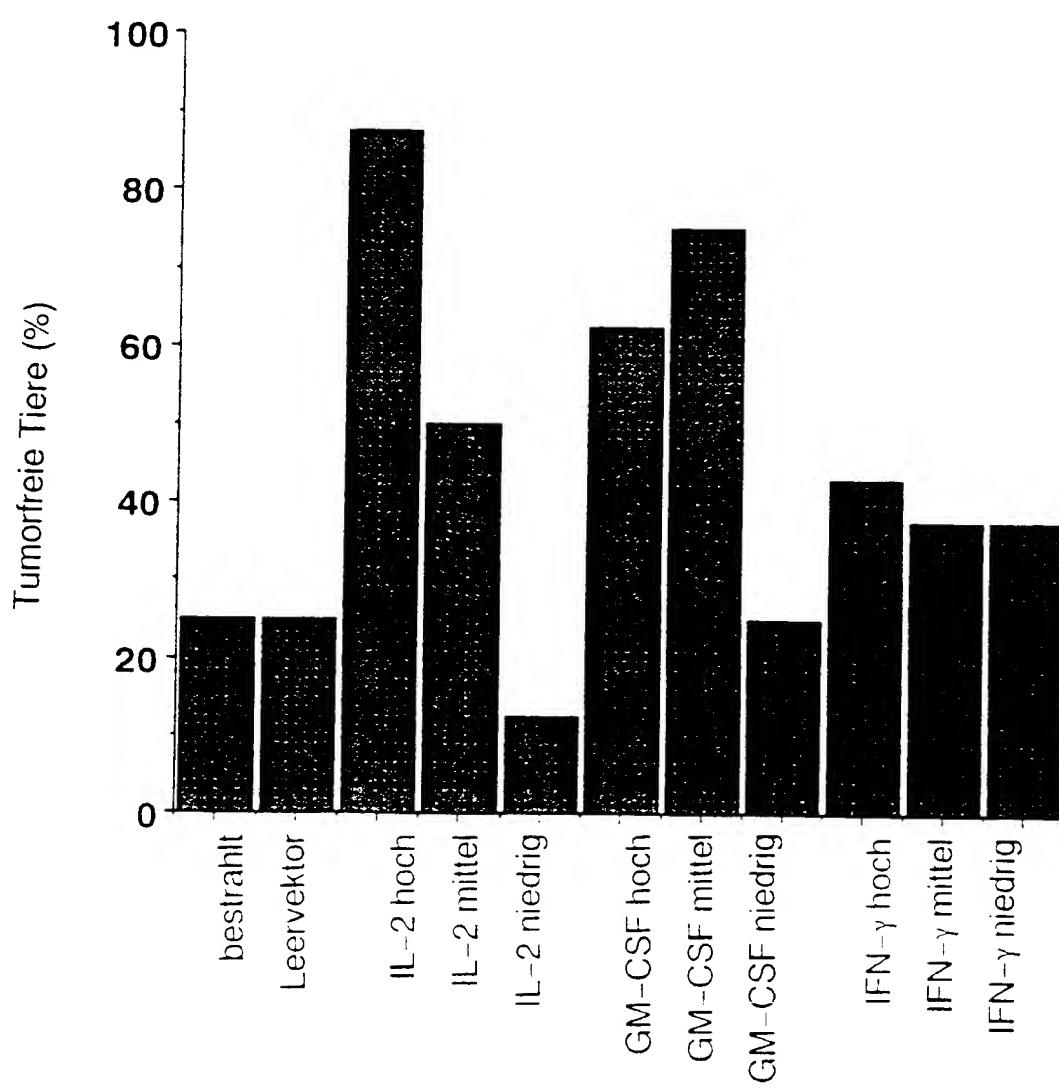


29/30

Fig. 29



30/30  
Fig. 30



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 94/00859

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5	C12N15/87	C12N7/04	C12N5/10	C12N15/44	C12N15/47
	A61K48/00	A61K47/48		//C12N15/23, C12N15/26	

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. CELL BIOCHEM. SUPPL. 0, (17 PART E) 1993 page 210 E. WAGNER ET AL. 'Receptor-mediated gene delivery and its augmentation by endosome-disruptive viruses or peptides'  Keystone symposium on genetically targeted research and therapeutics: Antisense and gene therapy, Keystone, Colorado, USA, April 12-18, 1993; abstract Nr S 320; see abstract --- -/-	1-4, 12-14, 18,22, 24-28, 30-34, 44,45, 50,52-55

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*'E' earlier document but published on or after the international filing date
- \*'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*'&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

15 June 1994

01.07.94

## Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patendaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

## Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/EP 94/00859

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. 16F 1992 page 47 H. FAKHRAI ET AL. 'Cytokine gene therapy of cancer using transduced fibroblasts' cited in the application Keystone symposia on molecular & cellular biology, Keystone, Colorado, USA, April 3-16, 1992; abstract Nr. V 208 see abstract ---	1-3, 12-14, 30-33, 44,45, 52-55
Y	ANN. NEW YORK ACAD. SCI. vol. 660 , 1992 , NEW YORK,US; pages 136 - 153 K. ZATLOUKAL ET AL. 'Transferrinfection: A highly efficient way to express gene constructs in eucaryotic cells' cited in the application see the whole document ---	1-3, 12-14, 30-33, 44,45, 52-55
P,X	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. 0, (17 PART D) 1993 page 129 K. ZATLOUKAL ET AL. 'Receptor-mediated cytokine gene delivery to tumor cells for generation of cancer vaccines' Keystone symposium on cellular immunity and the immunotherapy of cancer, Taos, New Mexico, USA, March 17-24, 1993; abstract Nr. NZ 522 see abstract ---	1-4, 12-15, 18,22, 30-34, 44-46, 50,52-55
P,X	GENE vol. 135 , 1993 , ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; pages 199 - 207 K. ZATLOUKAL ET AL. 'Somatic gene therapy for cancer: the utility of transferrinfection in generating "tumor vaccines"' Presented at the COGENE symposium, 'From the double helix to the human genome': 40 years of molecular genetics, UNESCO, Paris, 21-23 April, 1993: see the whole document ---	1-4, 12-14, 18,22, 30-34, 44,45, 50,52-55
P,X	EP,A,0 545 016 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL G.M.B.H.) 9 June 1993  see the whole document -----	1-4, 12-14, 18,22, 30-34, 44,45, 50,52-55

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No

PCT/EP 94/00859

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0545016	09-06-93	AU-A-	2652692	03-05-93
		CA-A-	2118816	31-03-93
		WO-A-	9307283	15-04-93
		FI-A-	941474	30-03-94

## INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Intell. des Aktenzeichen  
PCT/EP 94/00859

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 5 C12N15/87 C12N7/04 C12N5/10 C12N15/44 C12N15/47  
 A61K48/00 A61K47/48 //C12N15/23, C12N15/26

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 5 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	J. CELL BIOCHEM. SUPPL. 0, (17 PART E) 1993 Seite 210 E. WAGNER ET AL. 'Receptor-mediated gene delivery and its augmentation by endosome-disruptive viruses or peptides'  Keystone symposium on genetically targeted research and therapeutics: Antisense and gene therapy, Keystone, Colorado, USA, April 12-18, 1993; Zusammenfassung Nr. S 320; siehe Zusammenfassung ---- -/-	1-4, 12-14, 18,22, 24-28, 30-34, 44,45, 50,52-55

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfahrung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfahrung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfändischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfahrung kann nicht als auf erfändischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15. Juni 1994

15.06.94

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax (- 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

		Dok. Nr. nales Aktenzeichen <b>PCT/EP 94/00859</b>
<b>C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. 16F 1992 Seite 47 H. FAKHRAI ET AL. 'Cytokine gene therapy of cancer using transduced fibroblasts' in der Anmeldung erwähnt Keystone symposia on molecular & cellular biology, Keystone, Colorado, USA, April 3-16, 1992; Zusammenfassung Nr. V 208; siehe Zusammenfassung ---	1-3, 12-14, 30-33, 44,45, 52-55
Y	ANN. NEW YORK ACAD. SCI. Bd. 660 , 1992 , NEW YORK,US; Seiten 136 - 153 K. ZATLOUKAL ET AL. 'Transferrinfection: A highly efficient way to express gene constructs in eucaryotic cells' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-3, 12-14, 30-33, 44,45, 52-55
P,X	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. 0, (17 PART D) 1993 Seite 129 K. ZATLOUKAL ET AL. 'Receptor-mediated cytokine gene delivery to tumor cells for generation of cancer vaccines' Keystone symposium on cellular immunity and the immunotherapy of cancer, Taos, New Mexico, USA, März 17-24, 1993; Zusammenfassung Nr. NZ 522, siehe Zusammenfassung ---	1-4, 12-15, 18,22, 30-34, 44-46, 50,52-55
P,X	GENE Bd. 135 , 1993 , ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; Seiten 199 - 207 K. ZATLOUKAL ET AL. 'Somatic gene therapy for cancer: the utility of transferrinfection in generating 'tumor vaccines' Presented at the COGENE symposium, 'From the double helix to the human genome': 40 years of molecular genetics, UNESCO, Paris, 21-23 April, 1993; siehe das ganze Dokument ---	1-4, 12-14, 18,22, 30-34, 44,45, 50,52-55
P,X	EP,A,0 545 016 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL G.M.B.H.) 9. Juni 1993  siehe das ganze Dokument -----	1-4, 12-14, 18,22, 30-34, 44,45, 50,52-55

**INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

**PCT/EP 94/00859**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0545016	09-06-93	AU-A-	2652692	03-05-93
		CA-A-	2118816	31-03-93
		WO-A-	9307283	15-04-93
		FI-A-	941474	30-03-94

